



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Estandarización y validación del método in vitro HET– CAM para determinar la irritabilidad oftálmica de champús para bebés

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTORES

Mirelly Evelyn MAYTA ARIAS

Najhelind NIÑO DE GUZMÁN CORTEZ

ASESOR

Jesús Víctor LIZANO GUTIÉRREZ

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Mayta M, Niño de Guzmán N. Estandarización y validación del método in vitro HET– CAM para determinar la irritabilidad oftálmica de champús para bebés [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2018.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

"ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO *IN VITRO* HET-CAM PARA DETERMINAR LA IRRITABILIDAD OFTÁLMICA DE CHAMPÚS PARA BEBÉS"

Que presentan las Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:


**MIRELLY EVELYN MAYTA ARIAS Y
NAJHELIND NIÑO DE GUZMÁN CORTEZ**

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:


DECI OCHO (18) SOBRESALIENTE

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 22 de noviembre de 2018


Dr. Luis Miguel Visitación Félix Veliz
Presidente


Dra. Norma Julia Ramos Cevallos
Miembro


Mg. José Antonio Clahuilla Quea
Miembro


Mg. César Augusto Canales Martínez
Miembro

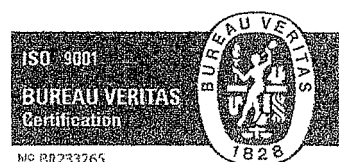
"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002, Jardín Botánico – Lima 1 – Perú

Teléfonos: (511) 328-4737 / (511) 679-7000 anexo 4826 Ap. Postal 4559 – Lima 1

E-mail: decanofyb@unmsm.edu.pe

<http://farmacia.unmsm.edu.pe>



DEDICATORIA

A mis padres Germán y Victoria,
por su amor, comprensión,
orientación y apoyo incondicional
en todo momento, porque son mi
motivación para crecer cada día.

A mis hermanos Kevin y Steve, por
su cariño, confianza, consejos y
por formar parte de mi vida.

A Julio, por lo que representa para
mí y por estar a mi lado todo este
tiempo brindándome su amor,
apoyo y comprensión.

A toda mi familia, por confiar en mí
y por permitirme ser parte de su
orgullo.

Mirelly Mayta Arias

DEDICATORIA

A mi mamá Melba Cortez Maldonado, por ser la motivación de mi vida, por estar siempre presente en cada uno de mis pasos alentándome a seguir adelante y a mi papá Gregorio Niño de Guzmán Ayvar por su apoyo incondicional.

A ti papa José, que siempre me incentivaste a seguir mis sueños y me enseñaste a luchar por ellos; a ti mamá Ispi, por estar a mi lado siempre brindándome tu cariño.

A mis tíos, familiares y amigos por ser parte de mi vida, por creer en mí y permitirme ser parte de su orgullo.

Najhelind Niño de Guzmán Cortez

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y a la Facultad de Farmacia y Bioquímica Alma Mater de nuestra profesión, por acogernos en sus aulas, formándonos para llegar a ser buenos profesionales.

A nuestro asesor Mg. Jesús Víctor Lizano Gutiérrez por su apoyo incondicional y orientación brindada para el desarrollo del presente trabajo.

A los distinguidos miembros del jurado examinador y calificador.

Presidente: Dr. Luis Miguel Visitación Félix Veliz

Miembros:

Dra. Norma Julia Ramos Cevallos

Mg. José Antonio Llahuilla Quea

Mg. Cesar Augusto Canales Martínez

Por sus consejos y sugerencias durante la corrección del presente trabajo.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivo General	2
1.2. Objetivos Específicos	2
1.3. Hipótesis.	2
II. GENERALIDADES	3
2.1. Antecedentes Internacionales.....	4
2.2. Antecedentes Nacionales	5
2.3. Marco teórico.....	7
2.3.2. Irritación ocular	8
2.3.3. Pruebas utilizadas para la evaluación de irritabilidad de productos cosméticos.	9
2.3.3.1. Ensayo in vivo (Test de Draize).	9
2.3.3.2. Métodos alternativos al ensayo de irritación ocular.	11
2.3.3.2.1. Ensayos de irritabilidad ocular in vitro	11
a) Ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina (Método HET-CAM)	11
b) Ensayo de irritabilidad en membrana corioalantoidea vascular (CAMVA).	12
c) Ensayo de la irritación de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS)	13
2.3.4. Bases legales	16
2.3.4.1. Normas Internacionales	16
2.3.4.2. Normas Nacionales.....	20
2.3.5. Conceptos básicos sobre champú.....	20
2.3.5.1. Controles de calidad fisicoquímico de los champús ²⁶	21
2.3.5.2. Materia prima e insumos utilizados en la elaboración del champú base.	22
2.3.5.3. Utilización de tensioactivos para champús y su relación con la irritabilidad ocular.....	23
2.3.5.4. Utilización de polietilenglicoles para formulaciones cosméticas y su irritabilidad ³⁰	24
2.3.6. Validación	24

2.3.6.1. Linealidad	25
2.3.6.2. Exactitud	26
2.3.6.3. Precisión	26
a) Repetibilidad	27
b) Reproducibilidad	27
c) Precisión intermedia	27
2.3.7. Incubación artificial de huevos de gallina.....	28
a) Temperatura.....	28
b) Humedad.....	28
c) Ventilación y recambio de aire	28
d) Volteo de los huevos	29
2.3.8. Desarrollo embrionario ³⁹	29
2.3.9. Evaluación de la integridad de la membrana celular ⁴⁰	30

III. PARTE EXPERIMENTAL31

3.1. Materiales y métodos	31
3.1.1. Tipo de estudio	31
3.1.2. Equipos.....	31
3.1.3. Materiales	31
3.1.4. Reactivos y solventes	32
3.1.5. Obtención de muestras.....	32
3.1.6. Representación gráfica del estudio.....	33
3.2. Evaluación de la irritabilidad ocular de los champús	34
3.2.1. Estandarización del método HET-CAM	34
3.2.2. Método HET-CAM (cualitativo)	35
3.2.3. Método cuantitativo de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de tripán CAM-TBS.....	37
3.2.4. Validación del método cuantitativo de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS)	40
3.2.4.1 Linealidad	40
3.2.4.2 Precisión.....	40
a) Repetibilidad	40
b) Precisión intermedia	41
3.2.4.3 Exactitud	41

IV. RESULTADOS.....42

4.1. Validación del método de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS).....	42
4.1.1. Linealidad	43
4.1.2. Precisión	44
4.1.2.1. Precisión Intermedia	44
4.1.2.2. Repetibilidad	47
4.1.3. Exactitud	49
4.2. Aplicación en tres marcas de champú para bebés.....	50
4.2.1. Método HET-CAM (cualitativo).	50
4.2.2. Método cuantitativo de la CAM mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS).....	53
V. DISCUSION.....	55
VI. CONCLUSIÓN	59
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
VIII.ANEXOS	65

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación para determinar la irritabilidad del producto, mediante método HET-CAM.....	36
Tabla 2. Clasificación para determinar la irritabilidad del producto, mediante método CAM-TBS.....	40
Tabla 3. Curva de calibración del colorante azul de tripán.....	42
Tabla 4. Linealidad para el control de hidróxido de sodio (NaOH).....	43
Tabla 5. Precisión intermedia del champú por cantidad de colorante absorbido (CCA) (nmoles/mg).....	45
Tabla 6. Prueba de Levene para evaluar la homogeneidad de varianza para el champú analizado considerando analistas.....	46
Tabla 7. Evaluación de la precisión intermedia, según parámetro de analista, en un sólo día de análisis.....	46
Tabla 8. Repetibilidad del champú analizado por cantidad de colorante absorbido (CCA) (nmoles/mg).....	48
Tabla 9. Evaluación de la repetibilidad con un solo analista.....	48
Tabla 10. Evaluación de la exactitud, mediante el porcentaje de recuperación.....	49
Tabla 11. Evaluación de la exactitud, mediante el porcentaje de recuperación y la correlación de Pearson.....	50
Tabla 12. Resultados de los controles del método HET-CAM.....	50
Tabla 13. Resultados de los champús analizados mediante el método HET-CAM.....	52
Tabla 14. Resultados del método CAM-TBS de los controles del estudio.....	53
Tabla 15. Resultados del método CAM-TBS de los champús analizados.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la anatomía del ojo.....	7
Figura 2. Esquema del estudio con los métodos <i>in vitro</i> basado en la membrana corioalantoidea CAM.....	33
Figura 3. Incubación artificial industrial de los huevos fertilizados.....	35
Figura 4. Preparación de la CAM de los huevos a analizar.....	37
Figura 5. Tinción y enjuague de la CAM.....	38
Figura 6. Curva de calibración del azul de tripán.....	42
Figura 7. Linealidad de hidróxido de sodio (NaOH).....	44
Figura 8. Evaluación del efecto del Hidróxido de sodio 0,1 N en la CAM.....	51
Figura 9. Evaluación del efecto del champú A, B y C en la CAM.....	53
Figura 10. Granja de la criandera Laura.....	71
Figura 11. Cámara de aire del huevo fertilizado.....	71
Figura 12. Capa superficial con suero fisiológico.....	72
Figura 13. Exposición de la capa superficial.....	72
Figura 14. CAM con champú.....	73
Figura 15. Método cuantitativo (CAM-TBS).....	73
Figura 16. CAM teñida.....	74
Figura 17. CAM teñida en tubos con Formamida.....	74

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Resultados de linealidad del método CAM-TBS.....	65
Anexo 2. Resultados de la Repetibilidad del método CAM-TBS.....	66
Anexo 3. Resultados de la Precisión intermedia del método CAM-TBS.....	67
Anexo 4. Resultados de exactitud del método CAM-TBS.....	68
Anexo 5. Resultados de la aplicación con el método CAM-TBS.....	70
Anexo 6. Centro de crianza de gallinas ponedoras de la criandera Laura.....	71
Anexo 7. Aplicación del método HET-CAM.....	71

RESUMEN

La utilización de métodos alternativos para determinar la irritabilidad oftálmica cada día va tomando más interés por la comunidad científica, por lo tanto, es importante demostrar la validez de estos métodos. El objetivo del presente estudio fue estandarizar y validar la prueba de irritabilidad oftálmica *in vitro*, utilizando el método del ensayo de la irritación de la membrana corialantoidea mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS), para evaluar champús destinados a bebés, comercializados en el Perú. Se evaluaron tres marcas de champús para bebés (marca A, marca B y marca C) de formulaciones similares comercializadas en el Perú. La estandarización y validación del método se realizó en el laboratorio de Toxicología y Química Legal de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) de la ciudad de Lima - Perú. Para la validación del método HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) se utilizó la marca B de champú y se evaluaron los siguientes parámetros: Linealidad, precisión y exactitud; y para la aplicación del método HET-CAM cualitativo y cuantitativo se evaluaron los índices de irritabilidad (I.I) de las tres marcas de champús para bebés. Los resultados de estos parámetros se sometieron a pruebas estadísticas demostrando que el método *in vitro* HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) propuesto para medir la irritabilidad oftálmica es lineal (correlación positiva y significativa, $R=0,998$), preciso (Precisión intermedia: CV día uno=1,185, CV día dos=1,887, prueba de Levene $p=0,054 \geq 0,05$ y t de Student $p=0,926 \geq 0,05$ para dos analistas; Repetibilidad: CV=2,7% y $p=0,988 \geq 0,05$ que indica que no existe diferencia significativa) y exacto (correlación de Pearson $R=0,99$; no existe diferencia significativa entre concentración y porcentaje de recuperación $p=0,06 \geq 0,05$). Por otro lado, los índices de irritabilidad (I.I) obtenidos clasifican a los champús como: el champú A resulta ser no irritante ($0,064081 \pm 0,010015 < 0,100$ nmoles/mg). El champú B y el champú C resultaron ser irritantes severos ($0,202561 \pm 0,004578 > 0,150$ nmoles/mg y $0,184801 \pm 0,005363 > 150$ nmoles/mg respectivamente).

Palabras clave: irritabilidad oftálmica, HET-CAM, CAM-TBS, validación, champú para bebés.

ABSTRACT

The use of alternative methods to determine ophthalmic irritability is taking more interest in scientific community every day, therefore, it is important to demonstrate the validity of these methods. The objective of present investigation was to standardize and validate *in vitro* ophthalmic irritability test, using the method of choriallantoic membrane irritability test by means of staining with trypan (CAM-TBS), to evaluate shampoos destined to babies marketed in Peru. Three brands of baby shampoos of similar formulations marketed in Peru were evaluated. The standardization and validation of method was performed in the Toxicology and Legal Chemistry laboratory of the National University of San Marcos (UNMSM), located in Lima, Peru. A brand of baby shampoo was used for validation of quantitative HET-CAM method (CAM-TBS) and the following parameters were evaluated: Linearity, precision and accuracy; and irritability indexes (I.I) of three brands of baby shampoos were evaluated for quantitative and qualitative HET-CAM method application. The results of these parameters were evaluated by statistical tests demonstrating that the quantitative HET-CAM *in vitro* method (CAM-TBS) proposed to measure ophthalmic irritability is linear (positive and significant correlation, $R = 0,998$), accurate (Intermediate precision: day one CV = 1,185, day two CV = 1,887, Levene's test $p = 0,054 \geq 0,05$ and Student's t $p = 0,926 \geq 0,05$ for two analysts; Repeatability: CV = 2,7% and $p = 0,988 \geq 0,05$ indicating there is no significant difference) and exact (Pearson correlation $R = 0,99$, there is no significant difference between concentration and recovery percentage $p = 0,06 \geq 0,05$). On the other hand, irritability indexes (I.I) obtained classify the shampoos as: shampoo A turns out to be non-irritating ($0,064081 \pm 0,010015 < 0,100$ nmoles / mg). Shampoo B and shampoo C were found to be severe irritants ($0,202561 \pm 0,004578 > 0,150$ nmol / mg and $0,1884801 \pm 0,005363 > 150$ nmol / mg respectively).

Key words: ophthalmic irritability, HET-CAM, CAM-TBS, validation, baby shampoo.

I. INTRODUCCIÓN

La capacidad ocular normal de un ser humano es balanceada e interdependiente de cualquier efecto químico, físico o mecánico; el cual puede alterar las funciones de los ojos, en dependencia de la extensión del daño fisioanatómico que pueda alterar la visión parcial o completa. Así un cosmético como producto químico, resultado de una formulación de un champú para bebés, es preparado para estar en contacto con el cabello para su higiene y puede penetrar a los ojos causando daño ocular por exposición accidental. Situación que involucra la responsabilidad civil del productor y de los profesionales de la ciencia de la salud¹.

Por tal motivo, diversos laboratorios emplean pruebas que ayudan a determinar la irritabilidad causada por algunos componentes de los champús; siendo la principal, la prueba de Draize. En contraposición a esta, por los problemas éticos debido a la utilización de animales, se han creado métodos alternativos como es el ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina (HET-CAM), que por su rapidez, simplicidad, su fácil ejecución y bajo costo, está siendo utilizado en Europa y algunos países latinoamericanos. Sin embargo, en el Perú, la utilización de métodos alternativos para evaluar toxicidad es escasa, ya que el referente institucional (Instituto Nacional de Salud) utiliza el método de Draize y el método de Draize modificado².

Es por ello que se resalta la importancia de ésta investigación, que permitirá aprovechar las ventajas del método *in vitro* de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina (HET-CAM) para estandarizarlo y validarlo, en el Laboratorio de Toxicología y Química Legal de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, como un método de referencia fundamental para evaluar irritabilidad oftálmica de champús para bebés.

1.1. Objetivo General

Estandarizar y validar la prueba de irritabilidad oftálmica *in vitro*, mediante el método de HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS), para evaluar champús destinados a bebés, comercializados en el Perú.

1.2. Objetivos Específicos

- a) Estandarizar la prueba de irritabilidad oftálmica *in vitro*, utilizando el método HET-CAM cualitativo y cuantitativo.
- b) Validar el método HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) en champú para bebés.
- c) Determinar el índice de irritabilidad oftálmica de tres marcas de champú para bebés.

1.3. Hipótesis.

La validación del método *in vitro* HET-CAM es aplicable para evaluar cualitativamente y cuantitativamente la irritabilidad oftálmica de los champús para bebés.

II. GENERALIDADES

En 1944, Jhon Draize y su equipo desempeñaron un papel muy importante en el desarrollo de métodos para evaluar la seguridad de los productos cosméticos antes de comercializarlos³. La evaluación de la irritabilidad ocular *in vivo* según el método de Draize requiere la aplicación de la sustancia de ensayo en la conjuntiva del animal de experimentación “conejo”, sometiéndolo, en muchos casos al dolor, ulceración y hasta necrosis de las estructuras oculares⁴.

Los ensayos toxicológicos, *in vivo*, se han empleado históricamente en la evaluación de la inocuidad y seguridad de los ingredientes de cosméticos. Sin embargo, en años recientes se ha criticado el empleo de tales ensayos, debido a los altos costos de ejecución, además del cuestionamiento, cada vez mayor, de los grupos de defensa de conductas éticas de experimentación en modelos animales y ambientalistas en la industria cosmética. El desarrollo de estos ensayos, y la actual demanda social y legislativa, propician la implantación de las tres “erres” (RRR) de Russell y Burch: reducción, refinamiento y reemplazo. En respuesta a este escenario, se ha dedicado esfuerzos y recursos a la búsqueda de ensayos toxicológicos alternativos, basados en análisis *in vitro*, todo lo cual ha motivado que exista una corriente de fomento para el desarrollo científico de métodos que contribuyan a disminuir la utilización de animales en las pruebas toxicológicas y control de sustancias⁵.

La normatividad mundial exige que la investigación científica incluya toxicidad o funcionalidad de los productos cosméticos, que sea evaluada con métodos alternativos al uso de animales de experimentación⁶.

El método CAM-TBS (HET-CAM cuantitativo) fue parte del proyecto titulado "Estudios sobre los métodos de ensayo para evaluar la seguridad de nuevos ingredientes de los cosméticos" del Ministerio de Salud y Bienestar japonés. Se encontró que tenía una variabilidad menor que el método HET-CAM, y mostró una buena correlación con la puntuación del promedio máximo de Draize (MAS, *máximum average score*) cuando se clasificaron los productos químicos

de ensayo de acuerdo con su estado líquido y sólido⁶. Éste método es aplicable en champús, así como en los ingredientes utilizados en su composición⁷.

2.1. Antecedentes Internacionales

González Y., *et al.*, presentaron el estudio titulado “Evaluación de la irritabilidad oftálmica de cremas cosméticas mediante un método *in vitro* en sustitución de la prueba en conejos” (Ophthalmic irritability evaluation of cosmetic creams by *in vitro* method in substitution of the test in rabbits). Se evaluó la irritabilidad oftálmica de tres cremas cosméticas desarrolladas en el Laboratorio Provincial de Cosméticos de Villa Clara (Cuba). El ensayo se realizó mediante la técnica alternativa *in vitro* en membrana corioalantoidea de embriones de pollo (HET-CAM, *hen´s egg test chorioallantoic membrane*) en sustitución de la técnica habitual de irritabilidad oftálmica en “conejos” (Draize) y en correspondencia con el Protocolo 47 de INVITOX (*In Vitro Toxicology*). En las condiciones del ensayo los cosméticos evaluados se clasificaron como no irritantes⁴.

Taha M., *et al.*, presentaron el estudio titulado “HET-CAM test. Application to shampoos in developing countries”. Su objetivo es proponer el método de HET-CAM como un método de detección del riesgo irritativo ocular de champús, adaptándolo a las condiciones técnicas y regulatorias de un país desarrollado como Argelia. Se evaluaron 6 champús producidos localmente (4 para adultos y 2 para bebés) al 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5% y 1,5%. Los resultados obtenidos muestran que el uso de una dilución al 10% clasifica a los champús para bebés y adultos en dos categorías diferentes de irritación. Se puede aplicar un enfoque de referencia usando esta concentración para evaluar el riesgo irritativo ocular de adultos y champús para bebés en países en desarrollo⁷.

Murillo G., *et al.*, presentaron la investigación titulada “Estudio comparativo de tres variantes del ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de la gallina para la evaluación de la irritación ocular”. Su objetivo fue comparar la utilidad de tres protocolos diferentes de la prueba de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina, descrita en una base de datos establecida de técnicas de Toxicología *in vitro*, evaluando la irritación potencial de diez sustancias químicas y formulaciones. Se compararon los datos con aquellos obtenidos en la prueba animal tradicional. Se halló una buena correlación con los datos del *test in vivo* para dos de los protocolos usados, en que tres sustancias fueron clasificadas como no irritantes y siete como irritantes en alguna magnitud. Sin embargo, se encontraron seis falsos negativos con la tercera prueba usada. Se discuten posibles causas para estos resultados. De las tres técnicas estudiadas la mejor es la que se basa en la utilización de azul de tripán ya que se trata de una técnica más rápida, de más fácil realización y con un resultado más fiable al evaluar los daños ocasionados en la membrana corioalantoidea de una forma objetiva y cuantificable⁸.

2.2. Antecedentes Nacionales

Inocente M. A., *et al.*, presentaron el estudio titulado “Efecto irritante *in vitro* de formulaciones cosméticas con extracto de camu camu, mediante el método Het Cam”. Su objetivo es evaluar el efecto irritante de formulaciones cosméticas con extractos de “camu camu”. Utilizaron la técnica alternativa *in vitro*, en membrana corioalantoidea en huevos fértiles de gallina (HET CAM, hen's egg test chorioallantoic membrane). Los resultados obtenidos mostraron que ninguno de los cosméticos produjo ruptura de la membrana corioalantoidea. Los índices de irritación (I.I) obtenidos en todas las formulaciones cosméticas permiten clasificarlas como NO IRRITANTES, y constituyen el soporte de la inocuidad de las mismas, para continuar con pruebas de eficacia clínica⁵.

Taype E. E. presentó la tesis titulada “Estandarización y validación del método HET-CAM para medir la irritabilidad ocular *in vitro* de los extractos

de cinco frutos nativos del Perú utilizados en la industria cosmética”. Su objetivo es estandarizar y validar el método HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) en cinco extractos de frutos nativos del Perú. Los frutos evaluados fueron *Physalis peruviana* L. (“aguaymanto”), *Myrciaria dubia* L. (“camu camu”), *Mauritia flexuosa* L. (“aguaje”), *Solanum sessiliflorum* D. (“cocona”) y *Passiflora mollissima* HBK (“tumbo serrano”). Estas frutas listadas son comúnmente utilizadas en formulaciones cosméticas. Se prepararon extractos acuosos, hidroalcohólicos y glicólicos. Para la validación del método HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) se evaluaron los parámetros: Linealidad, precisión, exactitud y robustez. Los resultados de estos parámetros se sometieron a pruebas estadísticas demostrando que el método HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) propuesto para la medición de la irritabilidad ocular *in vitro* es lineal, exacto y preciso pero no robusto⁶.

Rivera H. M. presentó la tesis titulada “Actividad irritante ocular *in vitro* por el método HET – CAM del extracto etanólico de la raíz, tallo y hojas de *Rumex crispus* L. (“cuturumasa”)”. Su objetivo fue determinar la actividad irritante del extracto etanólico de Raíz, Tallo y Hojas de *Rumex crispus* L. “cuturumasa”, mediante el método de HET CAM. Se prepararon 4 diluciones al 5%, 2%, 1% y 0,5% para las muestras de raíz, tallo y hojas, se trabajó con grupos control de Hidróxido de sodio al 0,1N, lauril sulfato de sodio al 1% y suero fisiológico; también se evaluó la actividad del solvente en las membranas corioalantoidea de huevos fértiles de gallina (“*Gallus gallus domesticus*”), con 9 días de incubación artificial. Se comprobó que la dilución al 0,5% del extracto etanólico de hojas, de *RumexCrispus* L. “Cuturumasa”, No produce rompimiento de la membrana corioalantoidea demostrado por la determinación del índice de irritabilidad (I.I) menor a 0,9. La raíz y el tallo si producen índice de irritabilidad (I.I) mayor a 1,0 en todas sus concentraciones. Se concluyó que los índices de irritación obtenidos al 0,5% del extracto etanólico de hojas, de *Rumex crispus* L. “Cuturumasa”, es clasificada como no irritante y constituye un soporte de seguridad para continuar con pruebas de eficacia clínica⁹.

2.3. Marco teórico

2.3.1. El ojo humano

En los humanos, el globo ocular (figura 1) tiene un diámetro de unos 2,5 cm. de su área de superficie total, sólo queda expuesta al ambiente la sexta parte anterior, mientras que el resto se encuentra protegido por los párpados y la órbita ósea. Desde el punto de vista anatómico, la pared de globo ocular consta de tres capas también denominadas túnica: la túnica fibrosa, la túnica vascular y la túnica nerviosa. La túnica fibrosa es la capa más externa y consta de la córnea, una lente transparente que se sitúa en la zona anterior, y la esclerótica, una capa opaca de tejido conjuntivo denso que proporciona elasticidad y rigidez al ojo. La túnica vascular o úvea es la capa intermedia y se compone de tres partes: coroides, cuerpo ciliar e iris. Finalmente, la túnica nerviosa es la capa más interna y está formada por la retina, una membrana donde se localizan los fotorreceptores y que se encuentra conectada al sistema nervioso central³.

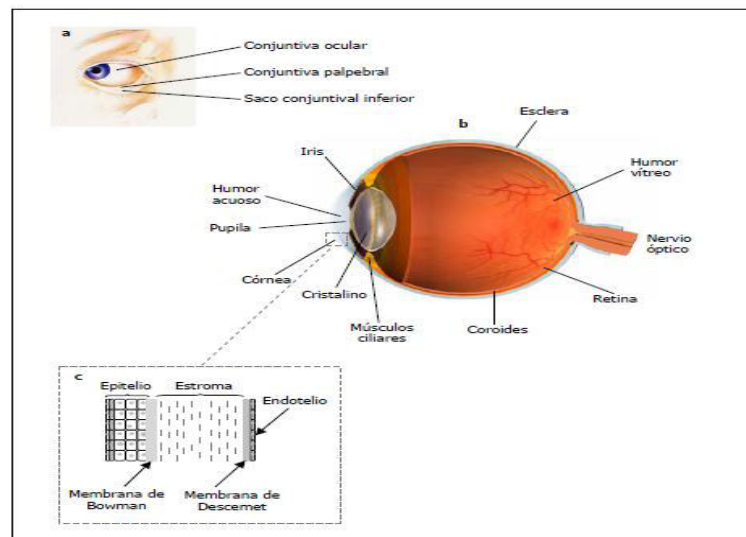


Figura 1. Esquema de la anatomía del ojo. En la parte superior (a) se muestra la localización de la conjuntiva que recubre la parte externa del globo ocular y la cara interna de los párpados. También se muestran todas las estructuras que forman el globo ocular (b) y la organización histológica de la córnea (c).

El ojo puede ser dividido funcionalmente en fotorreceptores (retina) que son los encargados de conectar los ojos con el sistema nervioso central a través de los nervios ópticos; en estructuras ópticas (córnea, iris, humor acuoso, lente, el cuerpo ciliar y el cuerpo vítreo) cuya función se basa en concentrar la luz visible sobre la retina y en estructuras protectoras, lubricantes y nutricionales. Todas estas funciones oculares se encuentran en un balance delicado, y cualquier lesión traumática, química o física puede afectarlas, creando un desorden de la visión y en dependencia de su alcance hasta pérdida parcial o total de esta¹⁰

2.3.2. Irritación ocular

La localización anatómica del ojo predispone a esta estructura a la exposición de una variedad de sustancias. Esta exposición, que puede ser accidental o voluntaria, puede provocar efectos adversos como la irritación. Por tanto, es muy importante que se evalúe el potencial irritante ocular de cualquier producto químico, farmacéutico o cosmético; esté destinado o no a su aplicación tópica³.

La irritación del ojo inducida por sustancias químicas involucra la exposición directa de organelos como la córnea, el iris y la conjuntiva. Los efectos sobre estas estructuras pueden ser detectados fácilmente mediante la observación conjunta.

El grado de daño causado por un agente externo en la mucosa ocular depende del pH, la capacidad de unión a proteínas epiteliales y de la penetración de este en la córnea. Cuando un irritante penetra en el ojo se activan los mecanismos protectores de este, la secreción de lágrimas aumenta y los vasos se dilatan en función de eliminar o reducir la presencia de tal compuesto. Si la irritación es severa la dilatación de los vasos aumenta y el fluido vascular y las proteínas filtran hacia la conjuntiva causando edema y como consecuencia se afecta el funcionamiento de los párpados. Las lesiones directas a nivel del iris se caracterizan por un incremento de la vascularidad, engrosamiento del estroma, disminución de la reacción a la luz, inflamación acuosa y/o destrucción del grosor del tejido¹⁰.

En las reacciones de irritación ocular, quizá el tejido más importante del globo ocular es la córnea ya que Algunas sustancias químicas pueden alterar la estructura de la córnea hasta el punto de perder transparencia, de modo que puedan provocar pérdida parcial de visión o incluso ceguera¹¹.

Cuando una sustancia irritante entra en contacto con la conjuntiva se inicia un proceso inflamatorio que puede provocar la dilatación de la red vascular de la conjuntiva confiriéndole a la membrana un aspecto enrojecido. Asimismo, se puede producir cambios en la permeabilidad de los capilares provocando la aparición de edemas al acumularse líquidos en los espacios intersticiales¹¹.

En el iris, la irritación puede provocar sobre esta estructura la dilatación de los vasos sanguíneos y la liberación de líquidos vasculares que provocan edema. Además, al producirse daños sobre el iris, la liberación de proteínas procedentes de la sangre al humor acuoso puede cambiar su índice de refracción provocando alteraciones en la visión¹¹.

2.3.3. Pruebas utilizadas para la evaluación de irritabilidad de productos cosméticos.

2.3.3.1. Ensayo in vivo (Test de Draize).

El método tradicional para el estudio de irritabilidad producida por los cosméticos, medicamentos y sustancias químicas sobre las membranas mucosas y la piel, ha sido el método de Draize, que data de los años 40^{10, 12}.

Este ensayo permite evaluar los efectos oculares que aparecen por la exposición aguda de los compuestos sobre la mucosa ocular del conejo, mediante la observación de las reacciones que ocurren a nivel de córnea, iris y conjuntiva, y de acuerdo con el sistema de Draize para evaluar la severidad de las lesiones oculares producidas es posible clasificar los compuestos en cuanto a su potencial irritante. Los resultados de este ensayo han sido usados durante años para la clasificación de diferentes compuestos y han constituido la base de la norma No. 405 adoptada por la Organización para la Cooperación y el

Desarrollo Económico (OCDE) en 1981 y de la norma ISO/DIC-10 993 No.10 adoptada en 1992 para la conducción de los ensayos de toxicidad ocular^{13, 14}.

Críticas y desventajas del método de Draize.

El ensayo de Draize desde sus inicios ha sido fuertemente criticado por la metodología empleada, la naturaleza subjetiva del ensayo, la relevancia del modelo animal utilizado y por el dolor que causa a los animales¹⁵.

La subjetividad del método Draize ha sido demostrada en diversos estudios interlaboratorios donde se han encontrado diferencias significativas entre los resultados¹⁶.

Algunos científicos opinan que la estimación se encuentra grandemente influenciada por el número de animales utilizados y la duración del período de observación¹⁷.

Otros han tomado como argumento fundamental las diferencias estructurales y fisiológicas que existen entre el ojo del conejo y el humano. En este aparece una membrana nictitante o tercer párpado que puede remover o atrapar el irritante lo que podría interferir en los resultados, su mecanismo lagrimal es menos efectivo existiendo diferencias en cuanto al grado y el tiempo de permanencia del irritante en el ojo, y además difieren en cuanto al pH del humor acuoso y el grosor medio de la córnea¹⁸.

El método de exposición de la sustancia de ensayo así como el volumen de aplicación también han sido cuestionados, debido a que no se asemejan a lo que ocurre en el hombre cuando es expuesto de forma accidental a cualquier agente externo¹⁹.

Debido a las controversias ocasionadas y a la necesidad de la obtención de resultados, se han desarrollado numerosos métodos para suplir los animales en los ensayos de irritación ocular y dérmica.

2.3.3.2. Métodos alternativos al ensayo de irritación ocular.

Los métodos alternativos incluyen a todos aquellos procedimientos que pudieran remplazar los experimentos realizados con animales, reducir el número de estos a utilizar en cada ensayo o refinar la metodología ya existente en busca de una disminución del dolor y el estrés, lo que se corresponde con el principio de las “tres erres”¹².

Entre los ensayos propuestos para sustituir al ensayo de Draize, podemos destacar a los métodos *in vitro*.

2.3.3.2.1. Ensayos de irritabilidad ocular in vitro

El ensayo de la membrana corioalantoidea (MCA) del huevo de gallina, conocido por las siglas HET-CAM de su nombre en inglés (*hen'segg test on chorioallantoic membrane*) es una prueba propuesta por Lüpke, modificada por Spielmann y por Steiling, que permite estimar *in vitro* el potencial de irritación ocular de sustancias y productos terminados⁸.

En este ensayo se valora de forma visual el tiempo de la exposición de la membrana a un determinado producto².

Años más adelante Itagaki y Col. produjeron una variante a esta técnica (CAM-TBS), que fue desarrollado para evitar la subjetividad de esos ensayos, que permite una cuantificación objetiva de las lesiones dado que se valora la cantidad de colorante azul de tripán que queda absorbido a la membrana lesionada².

a) Ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina (Método HET-CAM)

En el sistema del método HET-CAM, se determinan tres reacciones: hemorragia, lisis y coagulación de la membrana corioalantoidea al noveno día de embrionación cuando el tejido nervioso y la percepción del dolor aún no se han desarrollado²⁰.

Los huevos de gallina se incuban durante 10 días, después de ese tiempo los huevos defectuosos se descartan. La cáscara alrededor de la celda de aire se retira y las membranas internas se extraen para revelar la membrana corioalantoidea. Las sustancias de ensayo se añaden a la membrana y se dejan en contacto durante 5 minutos. La membrana se examina para evaluar el daño vascular y se registra el tiempo necesario para que se produzca la lesión. La irritación se obtiene de acuerdo con la gravedad y la velocidad a la que se produce el daño⁶.

Después de colocar la muestra de ensayo directamente sobre la CAM, se lleva a cabo una evaluación de los parámetros mencionados anteriormente durante un periodo de observación de 5 minutos. El enfoque más ampliamente utilizado es la determinación del tiempo de reacción hasta la aparición de cada uno de los tres puntos finales. Otro método es la determinación del umbral de irritación, que evalúa la concentración del material de ensayo en el que se observan los efectos sobre estos parámetros. Considerando que estos enfoques se utilizan principalmente para sustancias transparentes, un tercer enfoque para materiales insolubles y sólidos no transparentes puede ser utilizado mediante la exposición de la CAM para analizar muestras durante un tiempo fijo (30 segundos o 5 minutos) y el análisis de los puntos finales después de enjuagar para eliminar la muestra. Se ha encontrado que el período de exposición de 5 minutos a la sustancia de ensayo es suficiente para revelar efectos tóxicos/irritantes (la exposición más amplia no parece producir cualquier información adicional)²⁰.

b) Ensayo de irritabilidad en membrana corioalantoidea vascular (CAMVA).

El ensayo de irritabilidad en membrana corioalantoidea vascular (CAMVA, *The chorioallantoic membrane vascular assay*) evalúa los posibles efectos perjudiciales que las sustancias irritantes oculares potenciales producen en los vasos sanguíneos de la CAM del embrión. En la preparación de este ensayo se corta una pequeña abertura en la cáscara del huevo cuatro días

después de la fertilización y una pequeña cantidad de albúmina se elimina para permitir el crecimiento óptimo de la CAM. La abertura se vuelve a cerrar herméticamente y los huevos se incuban durante 6 días. El tiempo máximo de utilización de la CAM, en este ensayo se ha limitado a 10 días con el fin de cumplir con la legislación en los países de la Unión Europea que prohíbe los experimentos en embriones de pollo, mayores de 10 días⁶.

En el décimo día, la sustancia de ensayo se aplica directamente sobre una pequeña área de la CAM. Después de la exposición durante 30 minutos se examinan los cambios vasculares en la CAM, por ejemplo, hemorragia, lisis la aparición de vasos desprovistos de flujo de sangre (vasos fantasmas). La concentración de las sustancias en el ensayo que suscitan tales efectos perjudiciales en el 50% de los huevos, se calcula como parámetro toxicológico. Este ensayo proporciona una vasculatura funcional similar a la conjuntiva. Las sustancias activas actuarán sobre las células musculares lisas para dilatar o contraer los vasos capilares. El método CAMVA se utiliza en la industria cosmética principalmente en los EE.UU. para la detección y evaluación de la seguridad de los cosméticos. El diseño de tejidos humanos in vitro ha suplantado a los ensayos basados en la CAM; para las empresas⁶.

c) Ensayo de la irritación de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS)

La valoración de la posible capacidad de un producto de causar irritación ocular utilizando el método HET-CAM presenta el inconveniente de la subjetividad del experimentador a la hora de detectar la aparición de los efectos adversos. Para evitar eso, se desarrolló una nueva estrategia, el CAM-TBS que valora la capacidad del colorante azul de tripán de penetrar a través de las membranas lesionadas. En este ensayo se determina la cantidad de colorante absorbido por la CAM después de haber entrado en contacto con el producto, siendo así un método cuantitativo³.

El procedimiento experimental se basa en el protocolo INVITTOX N°108. Una vez expuesta la membrana al producto se depositan 0,5 mL de la solución de azul de tripán (0,1 % en solución buffer fosfato) y se deja actuar durante 1 min. Después de este tiempo, se lava la membrana, se corta y se coloca en una capsula de Petri con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. A partir de aquí, el protocolo incorporó una modificación (Vinardell y García, 2000) respecto al protocolo INVITTOX dado que para determinar la cantidad de colorante adsorbido en la membrana lavada, esta se pesa y se introduce en un tubo con 3 mL de formamida para extraer el colorante fijado al tejido. Cuando la formamida extrae todo el colorante, se descarta la membrana y se realiza la lectura de absorbancia de las muestras^{3,21}.

Ventajas y desventajas del método HET-CAM

Este ensayo presenta varias ventajas, incluyendo su sencillez, rapidez, sensibilidad, facilidad de funcionamiento y su bajo costo relativo. La principal desventaja del método HET-CAM (cualitativo) es la naturaleza subjetiva de la evaluación de los resultados. Esto se supera en cierta medida por la inclusión de estándares positivos en el método HET-CAM TBS (cuantitativo) y mediante el uso de un esquema integral para eliminar los efectos irritantes de los productos químicos²⁰.

En el ensayo de HET-CAM, las lesiones provocadas en la membrana se pueden correlacionar con las lesiones en la conjuntiva y en la córnea del ojo. En este caso, se pueden utilizar tanto productos líquidos, como polvos e incluso formulaciones acabadas. Se valora la lesión de la membrana y se pueden clasificar a los productos desde no irritantes a muy irritantes, según un sistema de gradación de la lesión. A pesar de no estar aceptado oficialmente, este método es muy utilizado por la industria cosmética¹².

Aunque el método HET-CAM, en principio, es aplicable a todos los tipos de productos químicos, independientemente de sus propiedades físico-químicas, mediciones en sustancias sólidas insolubles o consistentes

pueden ocasionar inconvenientes en la reproducibilidad de los resultados, mientras que los pigmentos y colorantes pueden causar interferencias mediante la tinción de la CAM⁶.

La mayoría de los estudios de validación realizados, mostraron una correlación útil entre el método HET-CAM y el Test de Draize para la evaluación de las materias primas, sustancias y productos cosméticos. Esta correlación *in vivo* frente a *in vitro* reveló resultados similares en el área de las sustancias de ensayo, así como para tensioactivos y formulaciones a base de tensoactivos³.

Aunque el HET-CAM se considera que es un método establecido y fiable para propósitos de tamizaje, una limitación potencial se puede ver en la ausencia de la posibilidad de evaluar la reversibilidad y/o irreversibilidad de los efectos. La gravedad de los efectos será evaluado por el método HET-CAM, mientras que por razones metodológicas de la recuperación o la persistencia de los efectos está fuera del alcance de los diversos protocolos del método HET-CAM utilizados en la actualidad. Por esa razón, el futuro papel del método HET-CAM puede limitarse a ser sólo un elemento de una batería de las pruebas de irritación ocular⁶.

El método CAM-TBS puede ser utilizado para evaluar polvos, cremas, líquidos no diluidos, o soluciones acuosas. También puede ser utilizado tanto para muestras solubles en agua y muestras poco solubles o insolubles. Una de sus principales ventajas es el hecho de que los productos químicos se pueden utilizar en las mismas concentraciones que se utilizan en ensayos *in vivo*, y por lo tanto una comparación directa se pueden hacer entre los datos *in vivo* y los datos del ensayo CAM²¹; además de que es un método cuantitativo y objetivo para determinar los resultados. Las sustancias coloreadas pueden interferir con la medición del punto final⁶.

2.3.4. Bases legales

2.3.4.1. Normas Internacionales

Un caso acaecido en 1933 en Estados Unidos significó el punto de partida para el desarrollo de métodos que garanticen la seguridad de los productos cosméticos. En respuesta a éste y a otros similares, su Congreso elaboró una Ley en 1938, la *Federal Food, Drug and Cosmetic Act*, que atribuía a los fabricantes la responsabilidad de la seguridad de sus productos cosméticos antes de comercializarlos³.

La legislación vigente en Europa determina que el uso de animales de experimentación debe estar científica y éticamente justificado. El modo de hacerlo varía entre los distintos países, pero todos coinciden en el fondo de la cuestión, ya que todos ellos analizan la idoneidad de los procedimientos respecto a los objetivos del proyecto, promueven la utilización del menor número de animales posible y obligan a los investigadores a demostrar que han considerado adecuadamente todas las alternativas a los procedimientos que causan dolor o malestar en los animales³.

La Unión Europea ha hecho énfasis en el desarrollo e implementación de nuevas técnicas para evaluar la eficacia y la seguridad de los productos cosméticos, y dentro de su legislación se encuentra una normativa relativa a la protección de los animales utilizados para experimentación y a otros fines científicos (86/609) del Comité de Ética Europeo (EEC), la cual enfatiza en lo siguiente: “Solo se emplearán animales en ensayos de laboratorio siempre y cuando se demuestre que los resultados experimentales no pueden obtenerse por otros procedimientos o alternativas”²². En la actualidad, la mayor parte de los países europeos sigue, en mayor o menor medida, las normas comunitarias sobre esta materia. En el caso concreto de España se incorporó esa Directiva mediante el Real Decreto 223/1986 que ha sido ampliado recientemente mediante el Real Decreto 1201/2005³.

Para que los datos toxicológicos suministrados por un método experimental puedan ser utilizados para la evaluación del riesgo/peligro y el registro de un nuevo compuesto químico, medicamento, fitosanitario, etc., se requiere que su

protocolo haya sido previamente validado científicamente y aprobado por las autoridades reguladoras. La aceptación por las autoridades reguladoras, de un nuevo procedimiento consiste en su aprobación e inclusión en las recomendaciones y normativas, tanto nacionales, como multinacionales (OCDE y la Unión Europea (EU, *European Union*), lo que le confiere validez para su aplicación en estudios de valoración del riesgo⁶.

Para impulsar el proceso de validación de nuevos procedimientos, la UE creó en 1991 el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM, *The European Centre for the Validation of Alternative Methods*). El centro norteamericano de validación, denominado Comité Coordinador de Inter-agencias para la Validación de Métodos Alternativos (ICCVAM, *The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*) ha centrado su actividad en revisar los resultados de estudios de validación patrocinados por otras instituciones²³.

La Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) acepta pruebas alternativas *in vitro* para clasificar posibles principios activos corrosivos, componentes de un producto, con el fin de minimizar el uso de animales y no someterlos a tratamientos que les genera malestar¹. También la EU (en la actualización de la Directriz 404) estableció un protocolo jerarquizado para detectar corrosivos o irritantes severos sobre ojos y piel. Tras considerar las propiedades fisicoquímicas, pH y el resultado de ensayos *in vitro* validados, los compuestos pueden ser clasificados directamente como irritantes severos sin experimentar en animales²³.

Sólo cuando no han resultado irritantes a nivel *in vitro* puede pasarse a su ensayo *in vivo*. En las directivas de la OECD no se definen cuáles son los métodos validados, aunque la legislación en Gran Bretaña acepta el método de la medición de la TER. Algunos países aceptaron ensayos para la evaluación de la irritación ocular producida por cosméticos mediante el método HET-CAM²³.

En el año 2003, cuatro métodos de ensayo alternativos fueron nominados por el ICCVAM y el Centro Inter-agencia para la Evaluación de Métodos

Toxicológicos Alternativos (NICEATM, *The NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods*) para su revisión como métodos de tamizaje para irritación/corrosión severa de los ojos: ICE (Ensayo en el ojo de pollo aislado), IRE (Ensayo en el ojo de conejo aislado), HET-CAM (Ensayo en la membrana corioalantoidea del huevo de gallina) y BCOP (Ensayo de opacidad y permeabilidad bovina). Varias autoridades de la EU ya habían aceptado estos métodos para la clasificación de sustancias irritantes/corrosivos graves²⁴.

La revisión de estos métodos ICCVAM celebrados con un informe del grupo especial de expertos en marzo del año 2005 y con el aval de ICCVAM de los métodos BCOP e ICE son como tamizajes válidos para los irritantes/corrosivos oculares severos. Sin embargo, ICCVAM ha determinado que los resultados negativos aún requieren pruebas *in vivo* antes de emitir la conclusión como no es grave/corrosivo. ICCVAM declaró lo siguiente: "En 2007, se recomiendan BCOP e ICE como pruebas de detección para la identificación de sustancias corrosivas e irritantes graves, con ciertas limitaciones; HET-CAM e IRE no se recomiendan para fines de clasificación reglamentaria de peligro, hasta desarrollarse y evaluarse más". La Agencia de Drogas y Alimentos (FDA, *Food and Drug Administration*) y la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, *Environmental Protection Agency*) informó de la aceptación previa de los datos de BCOP en circunstancias específicas y se espera que continúen haciéndolo teniendo en cuenta las recomendaciones del ICCVAM. El Comité Científico Asesor del ECVAM (ESAC) indicó que es necesario seguir trabajando para el IRE y en los métodos HET-CAM. Sin embargo, el método HET-CAM ha sido aceptado por las autoridades británicas, francesas, holandesas y alemanas (en conjunto con el ensayo de citotoxicidad NRU); al menos para la clasificación de los irritantes graves²⁴.

En Europa, se llevaron a cabo estudios de validación independientes por COLIPA. El Ministerio Federal de Investigación y Tecnología Alemán (BMFT, *Bundes Ministerium fuer Forschung und Technik*) junto con la Agencia Federal de Salud Alemana BGA (*Bundes Ges und heit sant-Alemania*) la Asociación Francesa para el bienestar de los animales de laboratorio (OPAL, *Oeuvre Pour*

L'assistance Aux Animaux de Laboratoire) y el estudio entre laboratorios llevado a cabo bajo los auspicios del Ministerio de Salud y Bienestar de Japón junto con la Asociación de la Industria Cosmética de Japón⁶.

La gestión de los riesgos asociados al uso de las sustancias químicas industriales en la Unión Europea se basa en la Directiva 67/548 de la Comisión sobre clasificación, embalaje y etiquetado de sustancias peligrosas, trata sobre los peligros potenciales intrínsecos que la sustancia puede producir³.

En Europa, el método HET-CAM (prueba de membrana corioalantoidea de huevo de gallina) ha sido aceptado para la identificación de irritantes severos como también documentado en la guía de la Unión Europea para el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de productos químicos (GHS).²⁵

En el sistema de prueba HET-CAM, se determinan tres reacciones, a saber, hemorragia, lisis y coagulación de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina fertilizado en el noveno día de la embrionación cuando el tejido nervioso y la percepción del dolor aún no se han desarrollado⁹.

Ensayo de irritación y sensibilización cutánea ISO 10993 10:2010

Esta parte de la norma ISO evalúa los posibles peligros del contacto con sustancias químicas liberadas de productos sanitarios, que pueden producir irritación cutánea y mucosa, irritación ocular o sensibilización cutánea. Tradicionalmente se realizan ensayos en animales pequeños antes del ensayo en seres humanos para ayudar a predecir la respuesta humana. Más recientemente, se han añadido ensayos *in vitro*, así como ensayos en seres humanos, como adjunto o alternativo. A pesar del progreso y esfuerzo considerable en esta dirección, una revisión de los resultados encontrados sugiere que actualmente no se han encontrado ningún ensayo *in vitro* satisfactorio para eliminar los ensayos *in vivo*. Cuando proceda se recomienda la utilización preliminar de métodos *in vitro* para fines de cribado antes de los ensayos con animales. Para reducir el número de animales utilizados, esta parte de la norma presenta un enfoque por etapas, con una revisión y análisis de los resultados de ensayo en cada etapa²⁶.

2.3.4.2. Normas Nacionales

La prueba de irritabilidad ocular en cosmética está dirigida a algunos preparados (rimel, sombras, champús) que por la forma de uso podrán introducirse accidentalmente en la mucosa del ojo. El método más empleado es el Draize y col. descrita en 1944 y que con algunas modificaciones es apropiado para evaluar colirios, fármacos y cosméticos. Las variaciones del método se basan en el número de aplicaciones de la muestra, tiempo de observación y forma de cuantificación⁸.

Las variaciones del método de Draize para la evaluación de cosméticos como por ejemplo champú, crema de párpados, sombras, rimel, etc; han sido realizadas no sólo para determinar el índice de irritación ocular que puede causar el producto por el uso continuo o la instilación accidental en el ojo, sino que tiene como objetivo conocer si el producto puede causar lesión en la córnea o daño ocular severo (índice ocular alto), así como comparar el efecto irritante ocular entre las diversas formulaciones de un mismo producto o lotes⁸.

Ley N° 30407: Ley de Protección y Bienestar Animal (Perú-2016)

Artículo 19. Centros que utilizan animales en actos de experimentación, investigación y docencia. Todo experimento, investigación y docencia con animales solo puede tener lugar en centros de educación superior y centros especializados públicos y privados que cuentan con comités de ética de bienestar animal únicamente cuando los resultados de estas actividades no puedan obtenerse mediante otros métodos que no incluyan animales y garanticen la mayor protección contra el dolor físico²⁷.

Las medidas de bienestar de animales utilizados en actos de experimentación, investigación y docencia están basadas en las buenas prácticas de manejo, bioseguridad y bioética de acuerdo con la especie animal, las cuales deben especificarse por el Ministerio de Agricultura y Riego²⁷.

2.3.5. Conceptos básicos sobre champú

La palabra champú proviene de una palabra hindú que significa “masaje”. La función principal del champú es remover las células muertas del cabello, así

como también los residuos que dejan el polvo, el aire, la contaminación y cosméticos como geles o fijadores; sin embargo, también tienen funciones adicionales que ayudan a resolver un problema del cabello. En la actualidad el champú forma parte de la vida cotidiana de las personas y de la higiene íntima²⁸.

Dongo P. menciona que Fred Winter, en su Tratado de Perfumería y Cosmética, define los champús como "preparaciones que producen una limpieza energética del cabello y cuero cabelludo. El mejor champú es un buen jabón neutro que en forma de polvo contenga un tanto por ciento de un álcali moderado, como el bórax o el bicarbonato sódico". El champú nació por la necesidad de aliviar problemas de salud, pues las sustancias antes empleadas para limpiar el cabello irritaban la piel o producían alergias. Los champús se encuentran, sin duda entre los artículos más demandados en el mercado de productos de higiene y cuidado personal²⁸.

El champú capilar es un preparado, producto de la formulación de uno o varios tensioactivos con otras sustancias empleadas como coadyuvantes de las primeras, que tienen propiedades espumantes y emulsionantes que va a permitir eliminar la suciedad, como también los residuos provenientes de la secreción sebácea y sudorípara²⁶.

2.3.5.1. Controles de calidad fisicoquímico de los champús²⁶

Para garantizar que el producto cumpla con las propiedades y características establecidas en la formulación final del producto.

Las pruebas organolépticas a realizar son: Olor, color y apariencia. Así, también deben evaluarse los siguientes parámetros:

- PH.- El pH de la formulación no puede ser ni muy ácido ni muy alcalino, debe tender a neutro. La razón es la siguiente, el cuero cabelludo tiene un pH ácido de 4 y el ojo un pH ligeramente alcalino de 7,5, debemos saber que cuando los pH son similares la irritación es menor, entonces si tendemos a que el champú iguale el pH del cuero cabelludo, se producirá una irritación excesiva en el ojo, y si tratamos de igualar el pH

del ojo, entonces la irritación se producirá en el cabello. El ojo es más sensible que el cuero cabelludo, por lo que se busca un punto central cercano a éste.

- Poder espumante, densidad relativa y viscosidad.

2.3.5.2. **Materia prima e insumos utilizados en la elaboración del champú base.**

En la elaboración del champú son necesarias ciertas sustancias que conforman la base del champú (tensioactivos, engrasantes, espesantes, ácidos) y otras complementarias (esencias y aceites esenciales) que le dan ciertas características especiales²⁸. De esta manera:

- Los tensioactivos (agentes limpiadores): Son los elementos principales en la formulación de los champús, también conocidos como surfactantes²⁸. Son los encargados de limpiar el cabello. Los más utilizados por los laboratorios son el lauril sulfato de sodio, lauril eter sulfato de sodio y el lauril éter sulfosuccinato de sodio. Este último es el más suave, y por eso es utilizado en los champús para niños y bebés²⁹.

Se clasifican en cuatro categorías²⁹:

- ✓ Surfactante Anfotéricos: Productos que según el pH de la solución pueden presentar tanto cargas positivas como negativas, al mismo tiempo. Todos los champús, con la excepción de algunos especializados, contienen un surfactante ya que este es necesario para la formación de la espuma, además de ser agente limpiador. Estas moléculas están formadas fundamentalmente por dos partes, una de las cuales es atraída por las grasas y aceites (lipofílica) y otra que es atraída por el agua (hidrofílica). Esta propiedad hermafrodita es la que permite que el agua, el aceite y las grasas, lleguen a estar íntimamente mezclados. Una cuidadosa selección de la mezcla de surfactantes dan al champú su habilidad de remover el sucio y el sebo, sin dañar o irritar el cabello y el cuero cabelludo.
- ✓ Surfactantes Aniónicos
- ✓ Surfactantes Catiónicos

✓ Surfactantes No-lónicos²⁹.

- El engrasante: Mantiene la humectación natural del cabello, tras la limpieza de los tensioactivos, para evitar la resequedad. Uno de los más usados es el dietanolamina de ácido graso de coco (DEA Cocamida); pero existen otros comunes como la lanolina o la lecitina. Todas estas grasas son extraídas de animales y vegetales²⁹.
- El espesante: Ayuda a que el champú tenga su consistencia espesa y sea más fácil de aplicar. El clorato de sodio es uno de los más usados por los laboratorios, pero en proporciones muy bajas, aunque algunos lo han sustituido por espesantes protectores como el PEG-120 dioleato de metilglucosamida, extraído del maíz²⁹.
- El ácido: Es el elemento encargado de equilibrar el champú, pues el cabello tiene un pH levemente ácido (entre 5,5 y 6), pero los tensioactivos son alcalinos (por encima de 7). Este ácido proviene generalmente de plantas o frutas, que permiten nutrir el cabello a la vez que balancean la fórmula del champú²⁹.
- Esencias e ingredientes activos: Son extractos de flores o plantas, que sirven para perfumar el champú y agregarle elementos nutritivos naturales. Hay muchos conocidos, como la menta, la lavanda o la manzanilla. Por otro lado, dependiendo de la marca de champú, se adicionan a la formulación ingredientes activos que ayudan a nutrir el cabello tales como las vitaminas A y E²⁹.

2.3.5.3. Utilización de tensioactivos para champús y su relación con la irritabilidad ocular.

Debido a su relativa capacidad para solubilizar a los lípidos de las membranas, muchos tensioactivos provocan irritación cuando entran en contacto con la piel u otras mucosas. Las propiedades fisicoquímicas de los tensioactivos son factores decisivos que determinan si la sustancia producirá irritación³. Uno de los principales, es su naturaleza dual (polar-apolar) que dará origen a la formación de micelas, característica importante ya que permite la interacción de los tensioactivos con membranas biológicas y la hemólisis³.

Los tensioactivos anfóteros como la Tegobetaína (Cocamidopropilbetaína) tienen como mínimo un grupo aniónico y un grupo catiónico y su actividad depende del pH del medio en el que estén disueltos. Estos tensioactivos se consideran no irritantes para el ojo y la piel y por ese motivo se utilizan mucho en champús para niños. La Tegobetaína se obtiene a partir de la reacción de ácidos grasos de coco (aceite de coco) con la dimetilaminopropilamina seguida de otras reacciones posteriores. Por tanto, se trata de una mezcla de diversos compuestos entre los que destaca una impureza, la dimetilaminopropilamina que, según los estudios realizados, sería una molécula responsable de las reacciones alérgicas³.

2.3.5.4. Utilización de polietilenglicoles para formulaciones cosméticas y su irritabilidad³⁰.

Los polietilenglicoles (PEG, *Polyethylene glycol*) y sus derivados aniónicos o no iónicos son ampliamente utilizados en cosmética como agentes tensioactivos, emulsionantes, acondicionadores de la piel, humectantes y de limpieza.

Debido a su presencia en muchos cosméticos, una evaluación de su seguridad es crítica, y más aún cuando el potencial de exposición de los consumidores puede ser crónico y extenso.

La característica excepcional de esta clase de compuestos es su solubilidad en agua y su capacidad para solubilizar otras sustancias en los preparados³⁰.

El PEG, sus éteres y sus ésteres de ácidos grasos producen poca o ninguna irritación ocular o dérmica, y tienen efectos tóxicos agudos y crónicos extremadamente bajos³⁰.

2.3.6. Validación

Es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecido³¹.

La validación proporciona un alto grado de confianza y seguridad del método analítico y se realiza con carácter obligatorio cuando se desarrolla un nuevo procedimiento, ya que permite asegurar que el método propuesto hace lo que tiene que hacer³².

2.3.6.1. Linealidad

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente o por medio de transformaciones matemáticas proporcionales a la concentración de la sustancia a analizar en la muestra dentro de un rango establecido³¹.

Para determinar el rango lineal se puede realizar mediante una gráfica de concentración versus respuesta. La función determinada por la regresión de la gráfica se conoce como Función Respuesta o Recta de calibrado, luego de establecido el rango, se determina la Curva de calibración.³³ En este sentido se recomienda abarcar valores cercanos al cero y valores superiores al LMP o al valor de interés. El número de puntos a analizar deberá ser establecido por el analista (en general, se utiliza un mínimo de 4 valores)³⁴.

Evaluación estadística

Generalmente el criterio de aceptación que se usa para determinar la linealidad es el coeficiente de correlación: El coeficiente de correlación indica el grado de relación entre la variable concentración X y la variable respuesta Y de la curva de calibración. El valor máximo de 1 indica una correlación positiva perfecta entre X, Y con una pendiente positiva. Cuando $r = 0$, no existe correlación alguna, independencia total de los valores X, Y.

De acuerdo a la Guía Técnica No. 1 del ISPCH (Santiago-2010), en la práctica si “r” tiene un valor cercano a uno 1, esto significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Para una curva de calibración o trabajo, es recomendable que el coeficiente de correlación obtenido sea mayor o igual a 0,999, aunque para el caso de trazas se admite un valor igual o mayor que 0,99³⁴.

2.3.6.2. Exactitud

Expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o valor de referencia y el valor experimentalmente encontrado³¹.

Para su evaluación se recomienda un mínimo de 9 determinaciones sobre 3 niveles de concentración del analito que cubran el rango especificado (3 determinaciones por tres niveles de concentración)³¹. Por ejemplo realizar el análisis a concentraciones de 80%, 100% y 120% por triplicado.

Matemáticamente se expresa en forma de error determinado, sistemático o sesgo, mientras menor es el sesgo mayor es la exactitud de un resultado³³.

Para determinar el sesgo puede utilizarse material de referencia, material fortificado o material control³³.

Porcentaje de recuperación

Es la medición que se obtiene al evaluar la concentración del analito en la porción de la muestra o adicionando a ésta (+/- 10%), que es cuantificada por el método de ensayo. Una vez que se han evaluado las características iniciales de la matriz a examinar, sumada a la cantidad de la sustancia a analizar suministrada adicionalmente, se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación⁶.

$$\%R = ((CF-CU)/CA) * 100$$

Dónde:

CF = Concentración de la sustancia, medida en la muestra fortificada.

CU = Concentración de la sustancia, medida en la muestra sin fortificar.

CA = Concentración de la sustancia adicionada.

2.3.6.3. Precisión

Es la capacidad de un método para proporcionar resultados próximos entre sí³¹.

El grado de precisión se calcula como desviación estándar de los resultados³³. Dentro del término precisión del método se pueden distinguir tres tipos de estudios:

a) Repetibilidad

La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un periodo corto de tiempo (misma muestra, mismo analista, mismo laboratorio, mismo equipo, mismo día, etc.)³³.

El ensayo de repetibilidad del método se efectúa sobre una serie de alícuotas (seis como mínimo) de una muestra homogénea que se analiza independientemente³¹.

Se evalúa determinando el coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (RSD)^{33,35}. Guía Técnica No.1 del ISPCH (2010-Santiago), mediante la siguiente ecuación:

$$CV \text{ o } RSD = (S/X) * 100$$

S: desviación estándar

X: media aritmética⁶.

b) Reproducibilidad

Se entiende la reproducibilidad como el desarrollo del procedimiento o método analítico en diferentes laboratorios, como por ejemplo en un estudio en colaboración. Se expresa con los mismos parámetros matemáticos que la repetibilidad³³.

c) Precisión intermedia

El objetivo de la precisión intermedia es determinar la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, en un mismo laboratorio pero en condiciones operativas diferentes.

En el estudio de precisión intermedia se debe considerar aquellas circunstancias en las que se pretende desarrollar el método de ensayo. El analista debe evaluar los efectos causados al variar una serie de factores. Típicos factores a estudiar incluyen el día, el analista, el instrumento, etc. No es necesario estudiar cada uno de estos factores individualmente sino que es suficiente comprobar que la variabilidad aportada por el conjunto de factores está dentro de los límites establecidos³¹.

La precisión intermedia expresa la variación dentro de un laboratorio por ejemplo en diferentes días, con diferentes analistas o con equipos diferentes, con la misma muestra homogénea³³. Para la combinación de estos factores las muestras deben ser preparadas independientemente y por triplicado³¹.

2.3.7. Incubación artificial de huevos de gallina

La incubación, natural o artificial, es el proceso por el cual el embrión finaliza su desarrollo morfológico, iniciado dentro de la gallina. Por tanto, la incubación artificial, debe entregar al huevo condiciones ambientales óptimas, similares a las del proceso natural, para el desarrollo embrionario³⁶.

La temperatura, la humedad, la ventilación y el recambio del aire y el volteo de los huevos son los cuatro parámetros fundamentales que intervienen en el proceso de incubación artificial^{37,38}.

a) Temperatura

El nivel óptimo de temperatura en el transcurso de la incubación en el caso de las gallinas es de 37° a 37,5°, mientras que en el tramo final del proceso (últimos dos o tres días) es necesario disminuir la temperatura. La regulación de la temperatura es de vital importancia durante la incubación, ya que las variaciones, incluso mínimas de temperatura pueden disminuir el porcentaje de éxito, causar deformaciones graves e incluso la muerte en el embrión.

b) Humedad

Los niveles óptimos de humedad oscilan entre el 40% y el 50%, mientras que en el último tramo del periodo de incubación, cuando el huevo ha agotado todas sus reservas de agua, se debe subir la humedad hasta el 65% para reblandecer las membranas y facilitar la eclosión del pollo.

c) Ventilación y recambio de aire

La ventilación del aire es un aspecto indispensable, sobre todo, cuando los embriones llegan a la última fase de su desarrollo. El aire que circula por el interior de la incubadora proporciona el calor y humedad necesarios para el

desarrollo del huevo, por lo que para asegurar una circulación de aire eficiente se requiere mantener la incubadora ventilada y que el aire interior se renueve periódicamente. La cáscara del huevo es porosa y al embrión le entrará el aire y el oxígeno a través de los poros. Por tanto, hay que tener en cuenta que según el embrión se va desarrollando y aumentando de tamaño dentro del huevo, va a ir requiriendo cada vez más cantidad de oxígeno para respirar. Es muy importante abrir la ventilación de la incubadora al máximo durante los últimos días de incubación. Cerrar la ventilación puede ocasionar la asfixia del embrión

d) Volteo de los huevos

Las gallinas, cuando están incubando en el nido, voltean y mueven sus huevos con bastante frecuencia. El volteo de los huevos es imprescindible, desde que los huevos se introducen en la incubadora hasta dos o tres días antes de que el pollo vaya a eclosionar, para que el desarrollo de los embriones se efectúe con total normalidad. Por tanto, durante la incubación artificial, este procedimiento debe imitarse haciendo uso de los dispositivos mecánicos de que dispone la incubadora.

2.3.8. Desarrollo embrionario³⁹

Intentar definir exactamente la edad del embrión a partir de una descripción morfológica presupone cometer errores. La velocidad del desarrollo embrionario varía en función de muchos factores, entre ellos el origen del huevo, la conservación previa, la temperatura de incubación, etc. Las diferencias son más notables los primeros días de la incubación. Sin embargo es necesario tomar parámetros para poder establecer comparaciones según la aparición de caracteres morfológicos precisos.

Desde el primer día ya se puede observar la formación de la cabeza y los ojos. Posteriormente aparecerá las patas y alas; al quinto día el embrión se ve perfectamente a simple vista y al séptimo día el pico, las patas y alas están perfectamente visibles. El día trece el embrión se encuentra cubierto de plumas y el día catorce ya finalizo el desarrollo y comienza el crecimiento. El día

dieciocho se completa el crecimiento y ya el día veintiuno inicia el picado de la cascara y finalmente se produce la eclosión y el nacimiento.

2.3.9. Evaluación de la integridad de la membrana celular⁴⁰.

Si una célula está muerta o en vías de morir, la función y estructura de la membrana celular se encontrará alterada. Esta alteración permitirá la incorporación al medio intracelular de moléculas hasta ese momento no permitidas o bien, el rechazo de moléculas que previamente se incorporaban a la célula. De acuerdo con estas propiedades, se han desarrollado diferentes test con el objeto de evaluar la integridad de la membrana plasmática. Se distinguen tres tipos de ensayos: los métodos que emplean sustancias colorantes o fluorescentes, los métodos basados en tinciones catiónicas, y los basados en la liberación de determinadas sustancias al medio extracelular. Los más usados son los que se basan en colorantes o moléculas fluorescentes.

Entre los métodos basados en colorantes y moléculas fluorescentes se distinguen ensayos de exclusión y de inclusión. En los ensayos de exclusión, si la membrana celular está íntegra, el colorante o la sustancia fluorescente no es capaz de atravesarla o bien esta es expulsada – excluida –por las bombas existentes en la membrana celular; por el contrario, si la membrana está dañada, el colorante o sustancia fluorescente atravesará sin dificultad la misma y permanecerá en el interior celular.

Entre los colorantes orgánicos más utilizados para los ensayos de exclusión, el azul de tripán es el colorante que más se ha utilizado hasta el momento. Con el método de viabilidad del azul de tripán, si la membrana plasmática está dañada, la célula se tiñe de azul – violeta, mientras que las células no dañadas aparecen translúcidas.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiales y métodos

3.1.1. Tipo de estudio

Estudio de tipo experimental con diseño cuasi experimental.

3.1.2. Equipos

- Balanza SARTORIUS CPA2245
- Espectrofotómetro JENWAY modelo 6715
- Microscopio óptico KOSSODO
- Incubadora semi-industrial.

3.1.3. Materiales

- Fiola de 10 mL (Pírex) con tapón de plástico.
- Fiola de 25 mL (Pírex) con tapón de plástico.
- Fiola de 50 mL (Pírex) con tapón de plástico.
- Fiola de 100 mL (Pírex) con tapón de plástico.
- Beaker de 100 mL (Pírex)
- Beaker de 250 mL (Pírex)
- Beaker de 500 mL (Pírex)
- Beaker de 1000 mL (Pírex)
- Pipetas graduadas 1 mL (Pírex)
- Pipetas graduadas 5 mL (Pírex)
- Pipetas graduadas 10 mL (Pírex)
- Pipetas volumétrica 1 mL (Pírex)
- Pipetas volumétrica 5 mL (Pírex)
- Pipetas volumétrica 10 mL (Pírex)
- Tubos de 10 mL
- Pinzas metálicas de tamaño pequeño
- Tijeras agudas/rectas
- Pissetas de 100 mL
- Jeringas de 1 mL
- Jeringas de 5 mL

- Jeringas de 10 mL .

3.1.4. Reactivos y solventes

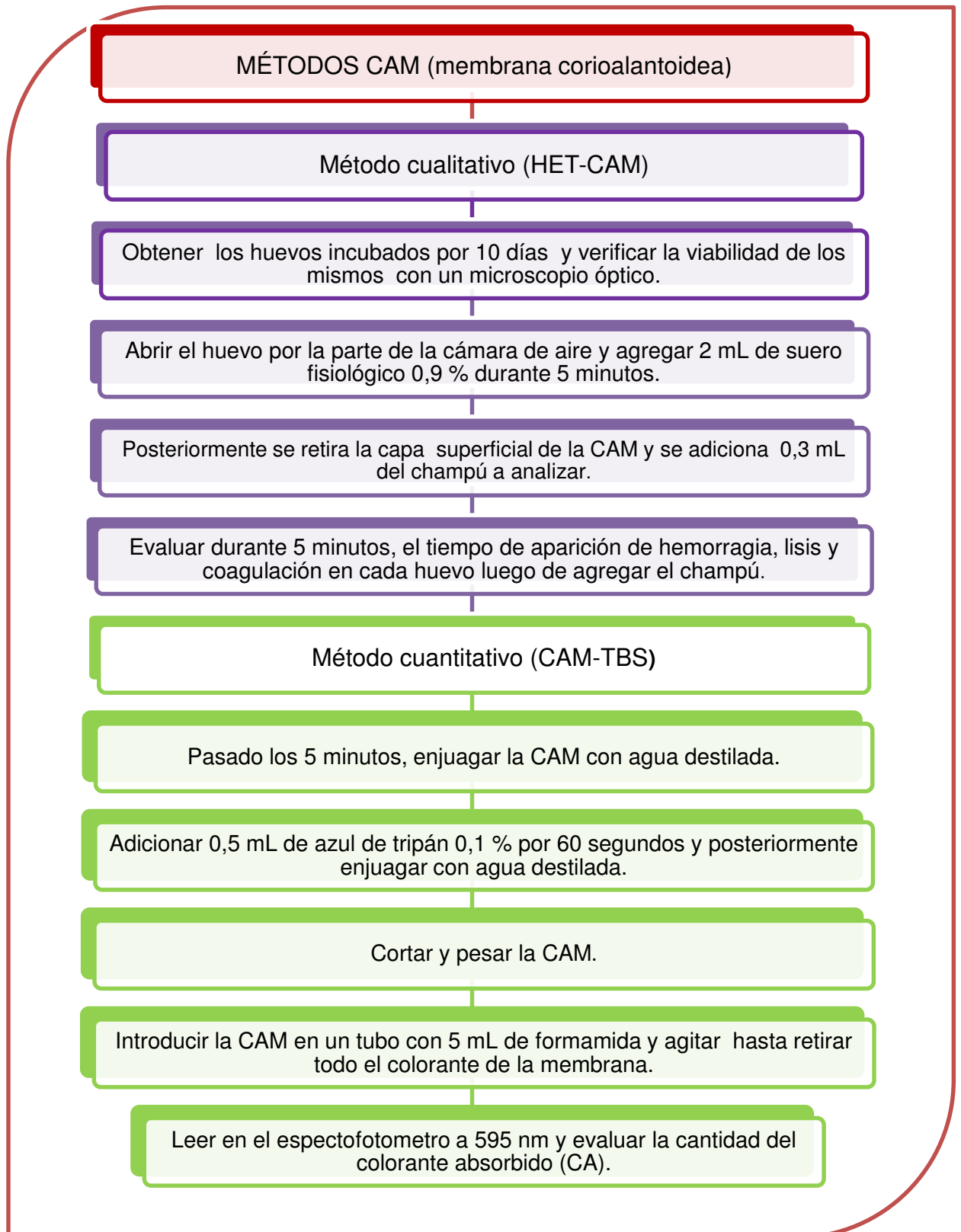
- Agua destilada
- Etanol 70%
- Suero fisiológico
- Azul de tripán p.a.
- Solución Buffer fosfato pH 7,0
- Formamida p.a.
- Hidróxido de sodio q,p.

3.1.5. Obtención de muestras

Las tres marcas de champús analizados: marca A (Tuinies NSOC21934-15PE), marca B (Petit bebé NSOC08178-11P) y marca C (Petit pon pon NSC:2006CO18608), fueron adquiridos en farmacias ubicadas en el Cercado de Lima. La marca de champú B fue utilizada para validar el método HET-CAM cuantitativo. Así mismo se determinó los índices de irritabilidad cualitativo y cuantitativo de las tres marcas de champú.

3.1.6. Representación gráfica del estudio.

Figura 2. Esquema del estudio con los métodos *in vitro* basado en la CAM.



3.2. Evaluación de la irritabilidad ocular de los champús

3.2.1. Estandarización del método HET-CAM

Se utilizaron huevos fértiles de *Gallus gallus domesticus* (especie resistente a enfermedades) suministrados por la criandera Laura Rivera de su granja “Santa Claudia”, en el distrito de Villa el Salvador, departamento de Lima, para estandarizar el método HET-CAM.

El proceso de incubación de los huevos comenzó entre 1 y 2 días después de ovado, los cuales se mantuvieron bajo condiciones normales de incubación artificial en una incubadora semi-industrial de 2500 huevos que se encontraba en la granja “Santa Claudia” (temperatura de $37,7^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de 55 – 60 % y rotación artificial cada 2 horas) hasta el décimo día (figura 3) en el que se recogieron los huevos y se determinó el potencial irritante, se tomaron aquellos que pesaron entre 50 y 60 gramos y se evaluó la viabilidad de los huevos fértiles, con observación en un microscopio óptico y luz artificial. Se escogió los huevos en los que se distinguía la disposición de venas de tamaño regular en la membrana corialantoidea y se excluyeron aquellos que no fueron fertilizados.

Para la validación del método se utilizó en promedio 90 huevos fertilizados:

- Linealidad: 15 huevos
- Repetibilidad: 15 huevos
- Precisión intermedia: 12 huevos
- Exactitud; 21 huevos

Para cada uno de los parámetros se sumó aproximadamente 6 unidades para evitar dificultades al encontrar huevos no viables durante la evaluación.

Para la aplicación del método HET-CAM cualitativo y cuantitativo se utilizó en promedio 13 huevos fertilizados más 7 unidades para evitar dificultades al encontrar huevos no viables durante la evaluación.



Figura 3. Incubación artificial industrial de los huevos fertilizados a temperatura de $37,7^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de 55 – 60 % y rotación artificial cada 2 horas.

3.2.2. Método HET-CAM (cualitativo)

Se realizó un orificio en la zona de la cámara de aire del huevo utilizando una tijera y una pinza, dejando expuesta la CAM, los huevos con la membrana corioalantoidea lesionada no fueron aceptados, ni aquellos que se desarrollaron anormalmente. Se adicionó 2 mL de suero fisiológico para humedecer la capa que cubre la CAM, durante 5 minutos. Luego se procedió a retirar la capa con una pinza metálica. Después se aplicó 0,3 mL de la marca de champú a evaluar, sobre la CAM expuesta (figura 4), la evaluación se realizó por triplicado. Como control positivo se utilizó la solución de NaOH 0,1N y como control negativo la solución de NaCl 0,9%; en estos casos sólo son necesarios 2 huevos por patrón según Inocente C, Toscano G, Castañeda C⁵. El tiempo (segundos) de la aparición de hemorragia, lisis y coagulación se anotó dentro de los 5 minutos y se ingresaron los datos a la siguiente ecuación:

$$\text{I.I.} = ((301 - \text{TH})/300) \times 5 + ((301 - \text{TL})/300) \times 7 + ((301 - \text{TC}) \times 9/300)$$

Dónde:

- **I.I.** = Índice de irritación*
- **TH** = Tiempo de aparición de hemorragia
- **TL** = Tiempo de aparición de lisis
- **TC** = Tiempo de aparición de coagulación

Ejemplo para una muestra:

Luego de añadido los 0,3 mL de champú al huevo, se toma el tiempo de aparición de lisis, hemorragia y coagulación en la membrana utilizando un cronometro.

- Para el primer huevo se obtuvo: hemorragia 150s, lisis 74s, coagulación 290s.
- Para el segundo huevo se obtuvo: hemorragia 195s, lisis 62s, coagulación 286s.
- Para el tercer huevo se obtuvo: hemorragia 160s, lisis 49s, coagulación 296s.

Posteriormente se procede a aplicar la fórmula:

- Para el primer huevo
$$I.I. = ((301-150)/300) \times 5 + ((301-74)/300) \times 7 + ((301-290) \times 9/300)$$
$$I.I. = 8,1433$$
- Para el segundo huevo: I.I. = 7,7933
- Para el tercer huevo: I.I. = 8,3800

Se saca el promedio de los índices de irritabilidad de los huevos utilizados:
 $I.I. = 8,1056$; clasificándolo como moderadamente irritante según la tabla 1.

Después de ingresar los datos en la ecuación anterior, se obtuvo el índice de irritación del champú analizado y de los controles utilizados, los cuales fueron clasificados según la siguiente tabla.

Tabla 1. Clasificación para determinar la irritabilidad del producto, mediante método HET-CAM

RANGO HET-CAM	CATEGORÍAS DE IRRITACIÓN
0 – 0,9	NO IRRITANTE
1,0 – 4,9	IRRITANTE LEVE
5,0 – 8,9	IRRITANTE MODERADO
9,0 – 21,0	IRRITANTE SEVERO

Fuente: Lüepke N⁴¹. García L.; Gleiby M.; Montes de Oca N.; Hidalgo L⁴².

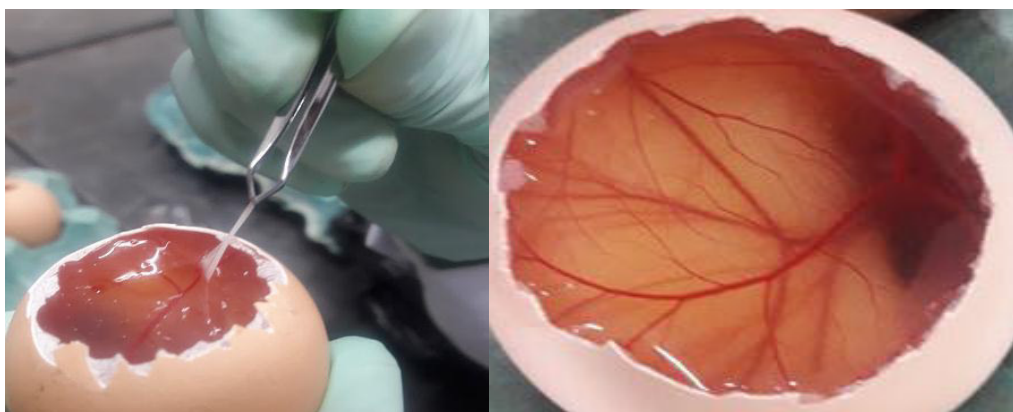


Figura 4. Preparación de la CAM de los huevos a analizar: Izquierda. Retiro de la membrana superficial de la CAM. Derecha: CAM lista para el contacto con la muestra de champú analizado.

3.2.3. Método cuantitativo de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de tripán CAM-TBS

Para el método CAM-TBS se efectuó, previamente, un escaneado (500-700 nm) para conocer el punto de máxima absorbancia del colorante (INVITTOX, protocolo N° 108)⁶.

Después de efectuado el método HET-CAM cualitativo, se procedió de la siguiente manera:

- La membrana se lavó con agua destilada y se colocó 0,5 mL de la solución de azul de tripán 0,1% en buffer fosfato, dejándola actuar durante 60 segundos. Luego, se separó el colorante en exceso con agua destilada, se cortó la membrana teñida de azul y se pesó en una balanza analítica (figura 5). La membrana lavada, se pesa para eliminar el sesgo de la diferencia en el tamaño de cada muestra. Posteriormente se introdujo en un tubo con 5 mL de formamida para arrastrar el colorante fijado y luego se retiró la membrana.

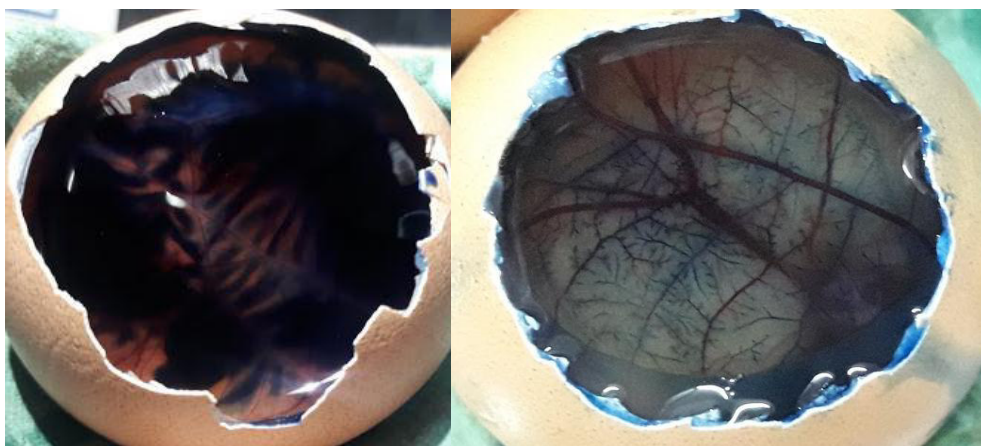


Figura 5. Tinción y enjuague de la CAM: Izquierda. Tinción de la CAM con azul de tripán. Derecha. CAM después de haber sido enjuagada con agua destilada.

- Se midió la absorbancia de la formamida con el colorante azul de tripán y se comparó frente a una recta patrón con concentraciones conocidas de este (5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M), a una longitud de onda de 595 nm. La detección del colorante absorbido por el espectrofotómetro indica la pérdida de la integridad de la membrana corioalantoidea que fue determinada mediante la ecuación siguiente.

La determinación del potencial irritante de la sustancia de ensayo se realiza según la ecuación:

$$CA = b \times 5/1000 \times 10^9 \text{ nmoles}$$

Dónde:

- CA= Cantidad de colorante absorbido*
- b = Concentración de colorante (obtenido por ploteo de la curva patrón) /mg de membrana.

*La cantidad de colorante absorbido es el resultado del método HET-CAM TBS (cuantitativo), ya que indica el daño ocasionado en la membrana corioalantoidea que es cuantificado por el espectrofotómetro.

Ejemplo para una muestra

Luego de realizar las lecturas en el espectrofotómetro se obtienen las siguientes absorbancias:

- Huevo 1 = 0,284 peso = 139,6
- Huevo 2 = 0,298 peso = 151,7
- Huevo 3 = 0,254 peso = 119,2

Para aplicar la formula anteriormente mencionada, primero se tiene que hallar la concentración de colorante por ploteo con la curva de azul de tripán:

$$b = ((\text{Abs} - 0,0507)/41197)/\text{mg}$$

- Huevo 1: $b = ((0,284 - 0,0507)/41197)/139,6 = 4,05661 \times 10^{-08}$
- Huevo 2: $b = ((0,298 - 0,0507)/41197)/151,7 = 3,95706 \times 10^{-08}$
- Huevo 3: $b = ((0,254 - 0,0507)/41197)/119,2 = 4,13995 \times 10^{-08}$

Luego se procede a aplicar la formula $CA = b \times 5/1000 \times 10^9$ nmoles para determinar la cantidad de colorante absorbido.

- Huevo 1: $CA = 4,05661 \times 10^{-08} \times 5/1000 \times 10^9 = 0,202831$
- Huevo 2: $CA = 3,95706 \times 10^{-08} \times 5/1000 \times 10^9 = 0,197853$
- Huevo 3: $CA = 4,13995 \times 10^{-08} \times 5/1000 \times 10^9 = 0,206998$

Se halló el promedio de las tres concentraciones siendo 0,202561 clasificado como severamente irritante según la tabla 2.

La comparación se realizó entre las CAM tratadas con el champú y los controles positivo y negativo. Con el resultado obtenido se determinó la clasificación de irritación, según la tabla 2.

Tabla 2. Clasificación para determinar la irritabilidad del producto, mediante método CAM-TBS.

CANTIDAD DE COLORANTE ABSORBIDO	CATEGORÍA
$\leq 0,100$ nmoles/mg	NO IRRITANTE
0,100 – 0,150 nmoles/mg	IRRITANTE MODERADO
$\geq 0,150$ nmoles/mg	IRRITANTE SEVERO

Fuente: García L.; Gleiby M.; Montes de Oca N.; Hidalgo L⁴².

3.2.4. Validación del método cuantitativo de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS)

3.2.4.1 Linealidad

En la linealidad del método CAM-TBS (cuantitativo) se determinó la linealidad del hidróxido de sodio (NaOH) como sustancia de referencia a las concentraciones de 0,01 N, 0,05 N, 0,08 N y 0,1 N, determinándose cada concentración por triplicado, calculándose la recta de regresión, el coeficiente de variación y el coeficiente de correlación.

Los resultados fueron procesados mediante el programa Excel 2010.

3.2.4.2 Precisión

Este parámetro incluye la repetibilidad y la precisión intermedia.

a) Repetibilidad

Para determinar la repetibilidad se realizaron 15 repeticiones de la evaluación del método CAM-TBS (cuantitativo) del champú analizado. Se determinó la desviación estándar, el coeficiente de variación y la prueba T de Student mediante los programas Excel 2010 y SPSS 25.

b) Precisión intermedia

Para la determinación de la precisión intermedia, cada uno de los 2 analistas realizó por triplicado la evaluación del método CAM-TBS (cuantitativo) del champú, durante 2 días por cada día de análisis; realizándose 12 determinaciones de la muestra. Se determinó la desviación estándar, el coeficiente de variación y la prueba T de Student mediante los programas Excel 2010 y SPSS 25.

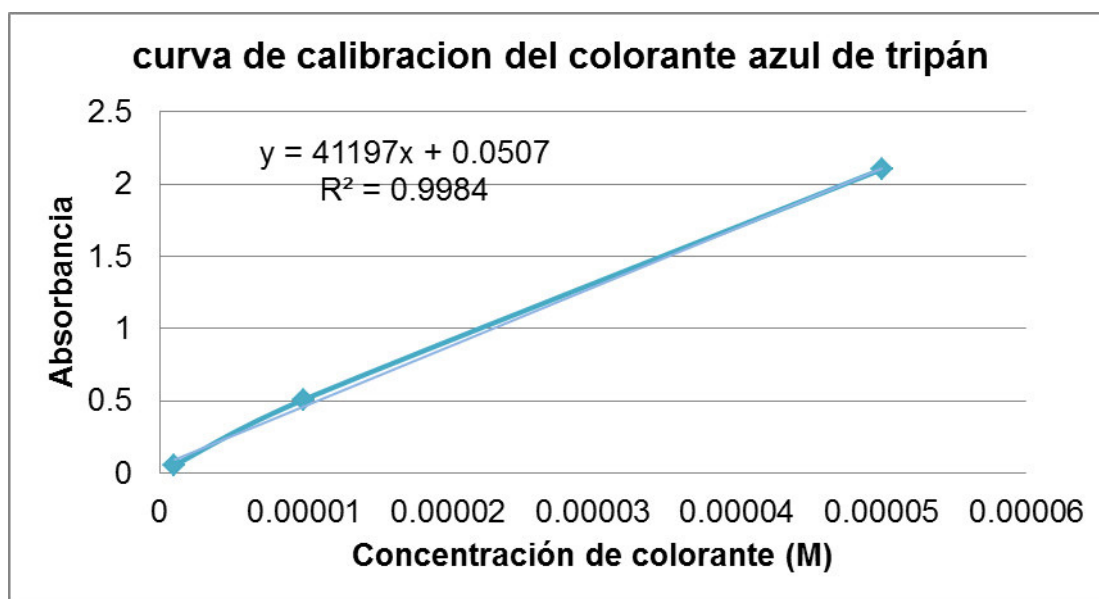
3.2.4.3 Exactitud

Para la determinación de la exactitud se empleó el método de adición de patrón a diferentes concentraciones: 0,08 N, 0,1 N y 0,12 N (80, 100 y 120 %) y por triplicado. Se aplicó la evaluación estadística, la prueba de Correlación de Pearson entre las concentraciones corregidas y el porcentaje de recuperación (%) de la muestra mediante Excel 2010 y SPSS 25.

IV. RESULTADOS

4.1. Validación del método de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS).

Figura 6. Curva de calibración del azul de tripán.



El $R^2 = 0,9984$ nos indica que los resultados son directamente proporcionales a la concentración del azul de tripán y la absorbancia.

Tabla 3. Curva de calibración del colorante azul de tripán.

Concentración	Absorbancias			Promedios
5×10^{-5}	2,105	2,100	2,101	2,102
1×10^{-5}	0,510	0,508	0,509	0,509
1×10^{-6}	0,054	0,054	0,055	0,054
Ecuación de la recta: $Y = 41197x + 0,0507$				

En la figura 6 se observa la curva de calibración del azul de tripán, para la cual se realizó la determinación por triplicado a tres concentraciones diferentes (Tabla 3), obteniendo así la ecuación de la recta que se utilizó en las fórmulas

para determinar la cantidad de colorante absorbido por la membrana corialantoidea que fue expuesta al champú analizado.

4.1.1. Linealidad

El índice estadístico que mide la relación lineal entre estas dos variables es el coeficiente de correlación obtenido.

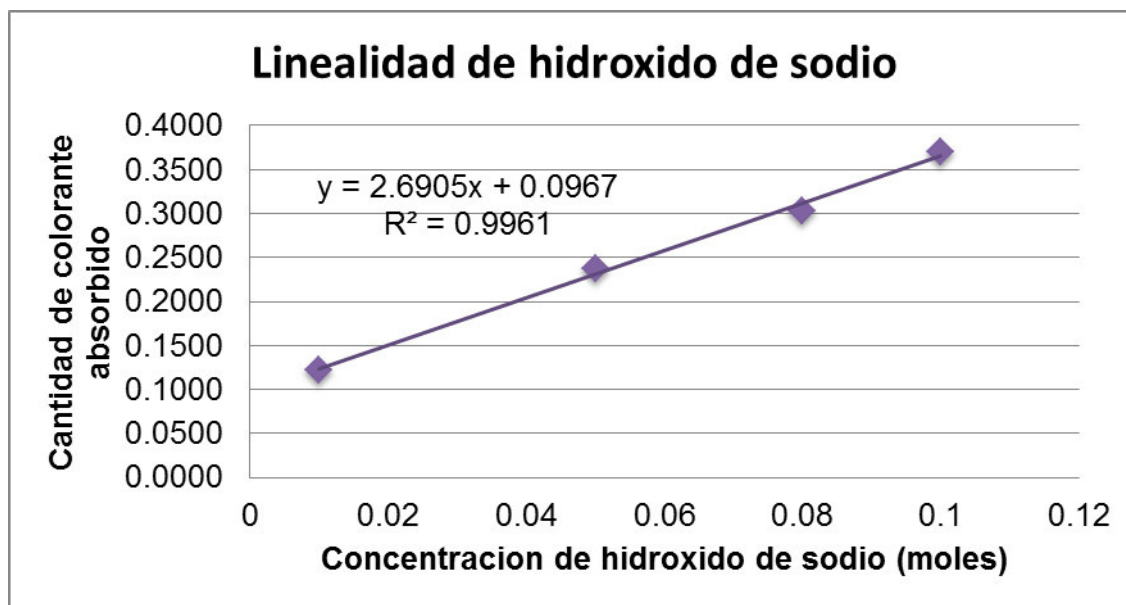
Este índice indica que existe una dependencia total entre las dos variables denominada relación directa; es decir, cuando una de las variables aumenta la otra también lo hace en idéntica proporción⁵. Véase en la siguiente tabla.

Tabla 4. Linealidad para el control de hidróxido de sodio (NaOH).

Concentración de hidróxido	Huevo N°	Cantidad de colorante absorbido	Promedio de cantidad de colorante	Coeficiente de variación	Coeficiente de correlación			
Suero	1	0,020366	0,020872 ± 0,000545	2,610073	-			
	2	0,021449						
	3	0,020801						
NaOH 0,01 N	1	0,121781	0,122343 ± 0,000722	0,590242	0,9980			
	2	0,122090						
	3	0,123157						
NaOH 0,05 N	1	0,231101	0,237055 ± 0,007170	3,024663		0,9980		
	2	0,235049						
	3	0,245014						
NaOH 0,08 N	1	0,297126	0,303176 ± 0,01592701	5,253389			0,9980	
	2	0,321241						
	3	0,291160						
NaOH 0,100 N	1	0,364776	0,370012 ± 0,006177	1,669279				0,9980
	2	0,376824						
	3	0,368435						

En la tabla 4 se observa los resultados de la cantidad de colorante absorbido por triplicado y su relación con la concentración de hidróxido de sodio.

Figura 7. Linealidad de hidróxido de sodio (NaOH)



En la tabla 4 se observa la correlación positiva y significativa entre X e Y ($R=0,9980$), determinándose que a mayor concentración de hidróxido de sodio, mayor cantidad de colorante absorbido, lo cual nos indica que el método es lineal (figura 7).

Los datos y resultados con mayor detalle se observa en el anexo 1. (Tabla 16)

4.1.2. Precisión

La precisión es la capacidad de un método para proporcionar resultados próximos entre sí. Grado de concordancia (grado de dispersión) de los resultados analíticos respecto a su valor medio⁴³.

4.1.2.1. Precisión Intermedia

La precisión intermedia evalúa la precisión del método frente a variaciones internas del laboratorio (analista, días, instrumento, etc). Es la precisión intralaboratorio⁴³.

La precisión intermedia se evaluó en el Laboratorio de Toxicología y Química Legal de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Ésta se evaluó por triplicado, en dos días y con dos analistas.

La desviación estándar del champú analizado nos indica que tan lejos se encuentra cada valor obtenido del valor promedio de la cantidad de colorante absorbido al ser realizado en diferentes condiciones (día, analista). Las desviaciones estándar obtenidas en los análisis de precisión intermedia para el champú, son relativamente pequeñas indicando que existe una agrupación de datos muy cercanos alrededor de la media.

El coeficiente de variación (CV) de los resultados obtenidos para la precisión intermedia no fue mayor al 3 % aceptado para espectrofotometría⁵³. En los resultados siguientes, se observa que con el promedio de los analistas 1 y 2, el CV que se presentó el día 1 fue 1,1850 y el CV que se presentó en el día 2 fue 1,8866, ambos se encuentran dentro de los criterios de aceptación.

Tabla 5. Precisión intermedia del champú por cantidad de colorante absorbido (CCA) (nmoles/mg).

Muestra	Analista	CCA (nmol/ mg)	Día 1	Día 2
Champú	Analista 1	C1	0,210747	0,203276
		C2	0,212802	0.203130
		C3	0,218416	0,209324
	Analista 2	C4	0,213834	0,198343
		C5	0,214229	0,199588
		C6	0,213217	0,202490
Promedio (CA)			0,213874	0,202692
Desviación Estándar			0,002535	0,003824
Coeficiente de Variación (CV)			1,185045	1,886604

C: Cantidad de colorante absorbido (nmoles/mg)

En esta tabla se observa los resultados obtenidos al analizar el champú en dos días diferentes y por dos analistas diferente (por triplicado en ambos casos).

Se determinó la prueba t de Student.

La igualdad de varianzas nos indica si podemos o no suponer varianzas iguales. Así si la probabilidad asociada al estadístico Levene es $\geq 0,05$, suponemos varianzas iguales; si es $<0,05$, suponemos varianzas distintas.

Tabla 6. Prueba de Levene para evaluar la homogeneidad de varianza para el champú analizado considerando analistas.

Muestra	gl	P
Champú	4	0,054

Prueba de Levene, si $p \geq 0,05$: no existen diferencias significativas

En el champú analizado existe igualdad de varianza entre los analistas 1 y analista 2 en un solo día ($p = 0,054 \geq 0,05$).

Tabla 7. Evaluación de la precisión intermedia, según parámetro de analista, en un sólo día de análisis.

Muestra	Champú	
Analistas	Analista 1	Analista 2
N	3	3
Media +	0,213988	0,213760
Desviación Estándar	0,003970	0,000510
P	0,926	

Prueba t de Student, si $p \geq 0,05$: no existen diferencias significativas.

En la tabla 7 se resalta que:

La media del analista 1 es $0,2140 \pm 0,0040$ y la media del analista 2 es $0,2138 \pm 0,0005$. En el champú analizado se encontró un $p \geq 0,05$, es decir no existen diferencias significativas entre los resultados de los analistas 1 y 2.

Los datos y resultados con mayor detalle se observa en el anexo 2. (Tabla 17)

4.1.2.2. Repetibilidad

La repetibilidad evalúa la precisión del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (aparatos, reactivos, analista) en un mismo laboratorio y en un periodo corto⁴³.

Para determinar la repetibilidad se realizaron 15 repeticiones del champú analizado (tabla 8) para obtener la desviación estándar, el coeficiente de variación en los resultados y verificar la dispersión que presentan los resultados.

La desviación estándar del champú analizado nos indica la lejanía de cada valor obtenido con el valor promedio de la cantidad de colorante absorbido (tabla 8). La desviación estándar obtenida en los análisis de repetibilidad para el champú analizado fue relativamente pequeña indicando que existe una agrupación de datos muy cercanos alrededor de la media.

El coeficiente de variación (CV) indica la relación que existe entre la desviación de una muestra y su promedio (tabla 8). Al dividir la desviación típica por el promedio se convierte en un valor de unidad de medida. El valor del CV en el champú evaluado para la repetibilidad fue menor al 3% aceptado para espectrofotometría⁴³.

Tabla 8. Repetibilidad del champú analizado por cantidad de colorante absorbido (CCA) (nmoles/mg)

Muestra	Huevo Nº	CCA (mmoles/mg)	Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de variación (CV)
Champú	1	0,207004	0,207122	0,005642	2,723755
	2	0,218243			
	3	0,201110			
	4	0,213664			
	5	0,207838			
	6	0,214231			
	7	0,211835			
	8	0,203303			
	9	0,204822			
	10	0,199460			
	11	0,198740			
	12	0,208013			
	13	0,206889			
	14	0,202932			
	15	0,208769			

Se determinó la prueba t de Student. Véase la tabla 9.

Tabla 9. Evaluación de la repetibilidad con un solo analista

Muestra	N	Media+	Desviación Estándar	P
Champú	15	0,207122	0,005642	0,988

Prueba t de Student, si $p \geq 0,05$: no existen diferencias significativas.

En la tabla 9 se resalta que:

La media de las cantidades de colorante absorbido obtenidas fue 0,207122. En el champú analizado se encontró un $p \geq 0,05$, es decir no existen diferencias significativas entre los resultados y la media obtenida entre estos.

Los datos y resultados con mayor detalle se observa en el anexo 3. (Tabla 18).

4.1.3. Exactitud

La exactitud es la capacidad que tiene el método para generar mediciones que se acerquen al valor verdadero, por esta razón se analizan tres concentraciones diferentes de hidróxido de sodio por el método de adición del patrón para observar su porcentaje (%) de recuperación en cada una de ellas⁶. Véase la tabla 10 y 11.

Tabla 10. Evaluación de la exactitud, mediante el porcentaje de recuperación.

	Promedio Colorante absorbido	Muestra	Promedio colorante absorbido	Concentraciones corregidas del champú	Porcentaje de recuperación (%)
-	-	Champú	0,183502	-	-
NaOH 0,08 N	0,305121	Champú + NaOH 80 %	0,312912	0,129410	42,412682
NaOH 0,1 N	0,375438	Champú + NaOH 100 %	0,383704	0,200202	53,324916
NaOH 0,12 N	0,401033	Champú + NaOH 120 %	0,473086	0,289584	72,209519

En esta tabla se observa los porcentajes de recuperación de hidróxido de sodio y la concentración de champú, que son obtenidos a partir de la cantidad de colorante absorbido. Estos resultados fueron evaluados mediante la prueba de Pearson.

Tabla 11. Evaluación de la exactitud, mediante el porcentaje de recuperación y la correlación de Pearson

Concentraciones corregidas de champú	Porcentaje de recuperación	
Champú	Correlación de Pearson	0,996
	P	0,055
	N	3

*La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

El champú analizado tiene correlación positiva y no existen diferencias significativas entre la concentración y el porcentaje de recuperación ($R = 0,99$; $p = 0,06 \geq 0,05$).

Los datos y resultados con mayor detalle se observa en el anexo 4. (Tabla 19 y tabla 20).

4.2. Aplicación en tres marcas de champú para bebés

4.2.1. Método HET-CAM (cualitativo).

Tabla 12. Resultados de los controles del método HET-CAM.

Control	Tipo de control	Tiempo de reacción (segundos)			Índice de irritación	Clasificación
		hemorragia	Lisis	coagulación		
Suero fisiológico	Control negativo	301	301	301	0	no irritante
Hidróxido de sodio* 0.1 N	Control positivo	135	155	165	10,2533	irritante severo
		140	148	158	10,5433	
		147	162	160	10,0400	

*ver la figura 8.

En la tabla 12 se observan los resultados obtenidos al realizar el método HET-CAM cualitativo. La CAM analizada con el suero fisiológico no obtuvo ningún tipo de reacción, por lo que se toma como tiempo de reacción 301 segundos que corresponde a pasados los 5 minutos que son considerados para aplicar la formula y obtener los índices de irritación.

A continuación, se muestran las imágenes observadas en el análisis del método HET-CAM del control positivo.

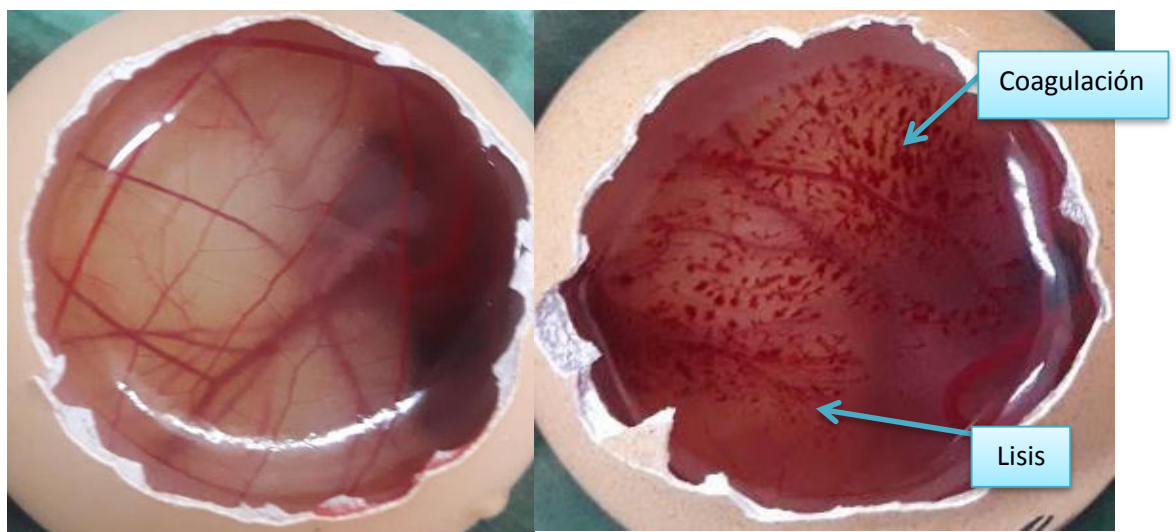


Figura 8. Evaluación del efecto del Hidróxido de sodio 0,1 N en la CAM:

- Izquierda sin adición del control positivo.
- Derecha, adición de NaOH 0,1 N, se observa lisis y coágulos

Tabla 13. Resultados de los champús analizados mediante el método HET-CAM.

Muestra a analizar	Tiempo de reacción (segundos)			Índice de irritación	promedio	clasificación
	Hemorragia	Lisis	Coagulación			
champú A	301	97	277	5,4800	5,7422	moderadamente irritante
	301	81	287	5,5533		
	301	78	268	6,1900		
Champú B	150	74	290	8,1433	8,1056	moderadamente irritante
	195	62	286	7,7933		
	160	49	296	8,3800		
Champú C	154	40	289	8,9000	8,7744	moderadamente irritante
	160	44	290	8,6767		
	173	42	282	8,7467		

*ver la figura 9.

En la tabla 13 se observa que las tres marcas de champú resultaron ser irritantes moderados:

- Champú A (I.I.: $5 \leq 5,7 < 8,9$)
- champú B (I.I.: $5 \leq 8,1 < 8,9$)
- champú C (I.I.: $5 \leq 8,8 < 8,9$)

Estos resultados son clasificados según la tabla 1 que nos indica la escala de irritación a la que corresponde.

A continuación, se muestran las imágenes observadas en el análisis del método HET-CAM de los champús.

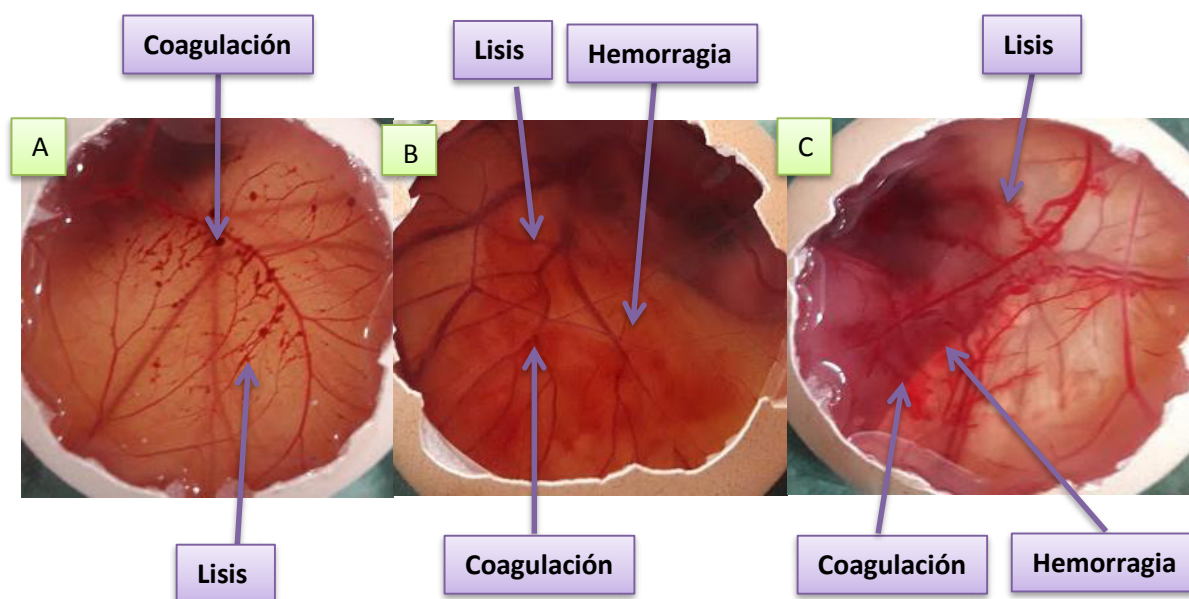


Figura 9. Evaluación del efecto del champú A, B y C en la CAM:

Izquierda: CAM con champú A, se observa lisis y coágulos

Medio: CAM con champú B, se observa lisis, coagulación y hemorragia.

Derecha: CAM con champú C, se observa lisis, coagulación y hemorragia.

4.2.2. Método cuantitativo de la CAM mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS)

Tabla 14. Resultados del método CAM-TBS de los controles del estudio

Control	Tipo de control	Cantidad de colorante	Promedio cantidad de colorante	Clasificación
Suero fisiológico	Control negativo	0,020064	0,020744 ±	No irritante
		0,021424	0,000962	
Hidróxido de sodio	Control positivo	0,363985	0,365496 ±	Irritante severo
		0,367006	0,002137	

En la tabla 14 se observa que el resultado del control negativo se clasifica como no irritante y el resultado del control positivo se clasifica como irritante severo, encontrándose dentro de los parámetros establecidos.

Tabla 15. Resultados del método cuantitativo CAM-TBS de los champús analizados.

Muestra	Cantidad de colorante	Promedio de cantidad de colorante	Clasificación
Champú A	0,055407	0,064081 ± 0,010015	No irritante
	0,075042		
	0,061794		
Champú B	0,202831	0,202561 ± 0,004578	Irritante severo
	0,197853		
	0,206998		
Champú C	0,180675	0,184801 ± 0,005363	Irritante severo
	0,182865		
	0,190863		

En la tabla 15. Se resalta que la marca de champú A resulta ser no irritante ($0,064081 \pm 0,010015 < 0,100$ nmoles/mg). El champú B y el champú C resultaron ser severamente irritantes ($0,202561 \pm 0,004578 > 0,150$ nmoles/mg y $0,184801 \pm 0,005363 > 0,150$ nmoles/mg respectivamente).

V. DISCUSION

Los métodos utilizados en experimentación, ensayo y enseñanza están en continuo progreso ya que los investigadores están en permanente búsqueda de posibles alternativas que mejoren la calidad de su trabajo. Ello es debido, en parte a la evolución de los conocimientos científicos y de sus aplicaciones tecnológicas, y en parte, a consideraciones éticas, logísticas, económicas, sociopolíticas y legales.

El proceso de estandarización del método fue fundamental ya que contribuyó a disminuir errores en la validación y aplicación a la hora de obtener los resultados. Estandarizar los días de incubación y el peso de los huevos nos permitió obtener vascularización y áreas similares de contacto con la muestra permitiéndonos así obtener resultados similares.

Los parámetros de validación evaluados del método fueron linealidad, precisión (precisión intermedia y repetibilidad) y exactitud.

Para determinar la linealidad de un método el parámetro estadístico es el coeficiente de correlación, el cual resultó ser lo esperado ($R = 0,9980$) como se puede observar en la tabla 4, en comparación con los resultados obtenidos en la tesis “Estandarización y validación del método HET-CAM para medir la irritabilidad ocular in vitro de los extractos de cinco frutos nativos del Perú utilizados en la industria cosmética” de Taype ($R = 0,9936$)⁶.

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad o el más–menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias, no conducen generalmente a resultados idénticos. Los factores susceptibles de influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista tiempo)⁴³. Sin embargo, los CV% obtenidos en la precisión intermedia con el promedio de analistas en ambos días se encuentran dentro del criterio aceptado para espectrofotometría³¹ y las medias de los analistas 1 y 2 en un solo día no presentan diferencias significativas como se

observa en la tabla 5. Así mismo, el CV% de la repetibilidad encontrado cumple con este criterio, la desviación estándar es relativamente pequeña y la media no muestra diferencias significativas con los resultados obtenidos (tabla 9). Nuestros resultados son similares a los obtenidos en un estudio realizado por Taype⁶, quien considera como criterio de aceptación ($CV\% \leq 10$). Por ello, se puede decir que nuestro método es preciso.

Al ser la exactitud un parámetro que mide la capacidad que tiene el método para generar mediciones que se acerquen al valor verdadero, se analizaron la concentración de hidróxido de sodio por el método adición de patrón en tres concentraciones diferentes. Los resultados de la tabla 10 fueron analizados por la estadística P de Pearson que nos dio como resultado que existe una relación estrictamente significativa entre la concentración y el porcentaje de recuperación demostrados en la tabla 11, que también fue demostrada con los resultados obtenidos de la tesis “Estandarización y validación del método HET-CAM para medir la irritabilidad ocular in vitro de los extractos de cinco frutos nativos del Perú utilizados en la industria cosmética” de Taype⁶. Los resultados del porcentaje de recuperación se muestran por debajo del 100%, esto puede ser debido a que el hidróxido de sodio reaccionó con los componentes presentes en el champú al ser este una mezcla acuosa.

Los ensayos basados en la utilización de la membrana corioalantoidea se han propuesto como métodos alternativos apropiados para valorar el potencial efecto irritante sobre el ojo de todo tipo de productos, pero especialmente para formulaciones que contienen tensioactivos³. Una de las clases de productos más comunes probadas en los estudios de validación de la prueba HET-CAM son champús para el cabello. Ellos tienen la ventaja de ser líquidos y carente de colorantes que conservan la CAM de ser manchada. Aunque la prueba HET-CAM está establecida y se considera prueba confiable para fines de detección, no puede reemplazar completamente a la prueba de Draize. La prueba actual de irritación ocular Draize evalúa los cambios observados en el segmento anterior del ojo, incluida la densidad y área de opacificación corneal, la gravedad de iritis, enrojecimiento conjuntival, edema y secreción. HET-CAM evalúa solo un segmento del ojo (conjuntiva) y debe completarse con modelos

de córnea. ICCVAM (2010) recomienda la prueba HET-CAM para estudios de validación u optimización no regulatoria.⁶ En un país en vías desarrollo como Perú, que autoriza la prueba de Draize para productos cosméticos, HET-CAM se puede usar como prueba previa antes de decidirse por un estudio en animales.

Aunque el HET-CAM no refleja parte de los efectos irreversibles in vivo, es utilizado por una variedad de consorcios de pruebas de toxicología para la identificación de corrosivos oculares e irritantes severos en una prueba de estrategia escalonada. En este enfoque, los resultados positivos de las pruebas in vitro se consideran una decisión sobre el peso de la evidencia para clasificar la sustancia como irritante ocular corrosiva o severa⁶.

Generalmente, la concentración de tensioactivos que se añade en las formulaciones no suele exceder el 5 % (p/v) aunque lo habitual es que oscile entre el 1 y el 2 %.³ Por ese motivo, se ha valorado el potencial irritante de tres formulaciones de champú para bebé. Cada champú se ha ensayado en tres huevos y los resultados individuales se muestran en la tabla 13. Según el ensayo HET-CAM (cualitativo), los tres champús se clasifican como moderadamente irritantes con respecto a la tabla 1. De los resultados individuales cabe destacar las diferencias de sensibilidad que pueden presentar las membranas para cada fenómeno considerado individualmente³. Nuestros resultados son similares a un estudio realizado por Taha, en el cual los champús para bebés analizados resultan irritantes moderados⁷.

También se ha valorado el potencial irritante de las tres formulaciones de champú para bebé mediante el método CAM-TBS según la tabla 2. A diferencia del ensayo HET-CAM, este método es cuantitativo de esa manera se elimina la subjetividad del experimentador a la hora de valorar los efectos sobre la membrana corioalantoidea. También se han ensayado en tres huevos y los resultados se muestran en la tabla 15. Según este ensayo el champú A se clasifica como no irritante y los champús B y C como irritantes severos. No obstante, no existe una clasificación predefinida del ensayo. Sin embargo, se ha utilizado una clasificación propuesta y publicada previamente por García⁴².

En el CAM-TBS también se detectan diferencias en la sensibilidad de las membranas corioalantoideas.

Los puntajes irritativos obtenidos con el control negativo (suero fisiológico) y el positivo (NaOH 0,1 N), satisfacen los criterios para una prueba aceptable⁶. Los controles de referencia pueden ser útiles para demostrar que el método está funcionando correctamente para detectar el potencial de irritación ocular de productos químicos de una clase química específica o un rango específico de respuestas, o para evaluar el potencial de irritación relativo de un producto irritante ocular²⁵.

VI. CONCLUSIÓN

- Se estandarizó la prueba de irritabilidad oftálmica in vitro, utilizando el método HET-CAM cualitativo y cuantitativo determinándose las condiciones óptimas para su aplicación.
- Se validó el método HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) en champús para bebés cumpliéndose los parámetros de linealidad, precisión y exactitud.
- Se determinó el índice de irritabilidad oftálmica de los tres champús para bebés, encontrándose que el champú A es no irritante y los champús B y C son irritantes severos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tobón F, Vallejo J. Perfil de tolerancia ocular de un cosmético para bebe *in vivo*. Revista Cubana de Farmacia. 2012; 46(1): 49-60.
2. Diseño e interpretación de Pruebas Farmacológicas en Control de Calidad. Serie de Documentos del Instituto Nacional de Salud. Lima. 1996.
3. Martínez O. V. Marcadores de irritación en modelos celulares y organotópicos alternativa a los ensayos *in vivo*, aplicado al estudio de tensioactivos de tipo lipoaminoácidos. [Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico]. Barcelona. Universidad de Barcelona. Facultad de Farmacia, Departamento de Fisiología. 2007.
4. González Y., Orestes A., Sánchez C., Molina J., Pizarro A., Silveira E. Evaluación de la irritabilidad oftálmica de cremas cosméticas mediante un método *in vitro* en sustitución de la prueba en conejos (*Ophthalmic irritability evaluation of cosmetic creams by in vitro method in substitution of the test in rabbits*). Revista Electrónica de Veterinaria (REDVET). 2006; 7 (3): 1-6.
5. Inocente M. A., Toscano E. M., Castañeda B. Efecto irritante *in vitro* de formulaciones cosméticas con extracto de “camu camu”, mediante el método Het-Cam. Horizonte Médico. 2013; 13 (2): 12-18.
6. Taype E. E. Estandarización y validación del método HET-CAM para medir la irritabilidad ocular *in vitro* de los extractos de cinco frutos nativos del Perú utilizados en la industria cosmética. [Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico]. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.
7. Taha M., Abdennourb S. HET-CAM test. *Application to shampoos in developing countries*. Toxicología In Vitro. 2017; 45 (3):393-396.
8. Murillo G., Pérez U., Vinardell M. P., García G. y Pascual J. R. Estudio comparativo de tres variantes del ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de la gallina para la evaluación de la irritación ocular. Rev. Toxicol. 2003; 20: 187-192.

9. Rivera H. M. Actividad irritante ocular *in vitro* por el metodo HET – CAM del extracto etanólico de la raíz, tallo y hojas de *Rumex crispus L.* (cuturru-masa)". [Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico]. Lima. Universidad Inca Garcilazo de la Vega; 2017.
10. Vega R., Álvarez M. Irritación ocular: Modelos alternativos. Rev Cubana Farm. 2001; 35(3): 211-218.
11. Curren R.D., Harbell J.W., *In vitro* alternatives for ocular irritation. Environmental Health Perspectives. 1998. Persp 106 Suppl 2, 485-492.
12. De La puente, Borrás, González, Llanas, Mitjans, Ramos, et al. Los métodos alternativos en el estudio de la seguridad de cosméticos. Revista de Toxicología. 2014;31 (2):140-148.
13. OECD *Guideline for Testing of Chemicals*: Guideline No. 405: acute eye irritation/corrosion. OECD Publication Office, París, 1987.
14. International Organization for Standardization. Draft international standard ISO/DIS 10993-10. Biol Eval Med Devices. 1992; 5:44-7.
15. York M, Sterling W. A critical of the assessment of the eye irritation potential using the Draize rabbit eye test. Appl Toxicol. 1998; 18:233-40.
16. Balls M, Bergi N, Brune L Curren R, De Silva O, Earl L, *et al.* Eye irritation testing: the way forward. There port and recommendations of ECVAM workshop. Altern Lab Animal. 1999; 27(1):53-71.
17. Goldberg A. M. Alternative Methods in Toxicology 9. In Vitro Toxicology Tenth Anniversary Symposium OFCAAT. New York: Mary Ann Liebert, 1993:107-15.
18. Cornier E.M., Hunter J.E., Billimer J., Farage M. A. The use of clinical and consumer eye irritation data to evaluate the low volume eye test. J Toxicol Cutan Ocular Toxicol. 1995; 14(3):197-205.
19. Weil C. Study of intra-interlaboratory variability in the result of rabbit eye and skin irritation test. Toxicol Appl Pharmacol. 1985; 25(2):139-143.
20. Spielmann H. The Ergatt/Frame, data bank of *in vitro* techniques in toxicology. HET-CAM Test. (Invitox Protocol 47) 1992: 1-9.
21. Itagaki H., Hagino S.; Kato S. The Ergatt/Frame, data bank of *in vitro* techniques in toxicology. CAM-TBS test. (Invitox Protocol 108). 1995:1-6

22. Sicán V. R. Determinación del potencial de irritabilidad ocular causado por surfactantes contenidos en champús para bebé aplicando el método de tolerancia *in vitro* con eritrocitos. [Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico]. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala; 2006.
23. Reppeto G., del Peso A., Zurita J., Métodos alternativos a la experimentación animal en la evaluación de la seguridad. Asociación Española de Toxicología. Alicante. 2004.
24. Ward S. Eye Irritation Commission / Serious Eye Damage. Non – animal Methods for Toxicity Testing. 2016. [acceso 08 de junio del 2018]. Disponible en: <http://alttox.org/mapp/toxicity-endpoints-tests/eye-irritationcorrosion/>
25. Scheel J., Kleber M., Kreubtz J., *et al.* Eye irritation potential: Usefulness of the HET-CAM under the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2011; 59: 471–492.
26. Samaniego J. J. Diseño y formulación de un champú a base de extracto alcohólico de *Urticaurens L* para su aplicación contra la caída del cabello. [Tesis para optar el Grado Académico de Magister en Ciencias Farmacéuticas con Mención en Ciencia y Tecnología Cosmética] Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.
27. El peruano. Normas Legales. Ley de Protección y Bienestar Animal: Ley N° 30407. Peru (revisado junio 2018)
28. Dongo C. P. Estudio de Pre-factibilidad para la implementación de una industria que elabore champú con extracto jojoba. [Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Industrial] Lima. Pontificia Universidad Católica del Perú; 2007.
29. Toma S., Cerna J. Validación como metodología de mejora y control de proceso en una industria cosmética. [Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Industrial] Lima. Universidad Nacional de Ingeniería; 2010.

30. Fruijtier-Pölloth C. Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. *Toxicology*. 2005; 214: 1-38.
31. Asociación Española de Farmacéuticos en la Industria (AEFI). Validación de métodos analíticos. 2001.
32. Fernández S. A., Aguilera C. Y., Morales L. I., Alonso J. E. Validación de los métodos analíticos para la identificación y cuantificación del dextrometorfano jarabe. *Rev Cubana Farm*. 2002; 36(1): 28-34.
33. Bravo Méndez R. "Guía técnica para realización de la validación de métodos de ensayo". Ministerio de Salud. Instituto de salud pública de Chile. 20 de enero del 2015. [citado 13 de junio de 2018]. Resol. AI/N"86. Disponible en:
http://www.ispch.cl/sites/default/files/resolucion/2015/01/resoluci%C3%B3n_exenta_201_2015.pdf
34. Sandoval S. et al. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos" Santiago, Diciembre de 2010. [citado 15 de junio de 2018] Véase en:
http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2010/12/guia_tecnica_1_validacion_de_metodos.pdf
35. Arias G. LM. Validación de un método analítico para la cuantificación de vitamina en alimentos, por cromatografía líquida de alta resolución y su determinación en guayaba fresa (*Psidium cattleianum sabine*). Tesis de grado. Guatemala de la Asunción. Universidad Landivar. 2014 [citado 11 de junio de 2018]. Véase en:
<http://biblio3.url.edu.gt/Tesario/2014/02/02/Arias-Luisa.pdf>
36. Ruiz N., Orrego G., Reyes M., Silva M. Aumento de la Temperatura de Incubación en Huevos de Gallina Araucana (*Gallus inauris*): Efecto sobre la Mortalidad Embrionaria, Tasa de Eclosión, Peso del Polluelo, Saco Vitelino y de Órganos Internos. *Int. J. Morphol.* [Internet]. 2016 Mar [citado 2018 Jun 14]; 34(1):57-62. Disponible en:
https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022016000100009

37. Boleli I, Morita V, Matos J, Thimotheo M, Almeida V. Poultry Egg Incubation: Integrating and Optimizing Production Efficiency. Brazilian Journal of Poultry Science. 2016 Set [access 2018 Jun 14]. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rbca/v18nspe2/1516-635X-rbca-18-spe2-00001.pdf>
38. Castillo R. Guía de incubación. Avicultura 2011 Oct. {citado 2018 Jun 14}. Disponible en: <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/guia-incubacion-t28445.htm>
39. Ricaurte SL. Embrio diagnosis y ovoscopia. Análisis y control de calidad de los huevos incubables. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET - ISSN 1695-7504. Bogotá. Marzo 2005. [Citado 2018 Jun 13] Vol. VI, Nº 3. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030305/030504.pdf>
40. Martín P. M. Evaluación de los perfiles de viabilidad celular de células madre de la pulpa dental y de la gelatina de Wharton como control de calidad para su uso en Ingeniería Tisular. [Tesis Doctoral]. Granada. Universidad de Granada. Facultad de Medicina, Departamento de Histología. 2014
41. Lüpke N. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. Food and Chemical Toxicology. 1985; 23 (2): 287-291.
42. García L., Gleiby M., Montes de Oca N., Hidalgo L. Estudio de irritación ocular y dérmica de *Pochonia chlamydosporia* var. Catenulata. Rev. Toxicol. 2004; 21 (2-3): 103-107.
43. COFEPRIS: Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios [Internet]. México: COFEPRIS; 2011 [citado 30 jun 2018]. Comisión de control analítico y ampliación de cobertura. Disponible en: <http://www.cofepris.gob.mx/TyS/Documents/TercerosAutorizados/cvfq032011.pdf>

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Resultados de linealidad del método CAM-TBS

Tabla 16. Linealidad para el hidróxido de sodio (NaOH).

Muestra	Huevo N°	ABS	Concentración de colorante (moles)	Conc/mg	Cantidad de colorante absorbido (nmoles/mg)
NaOH 0,01 N	1	0,257	$5,0076 \times 10^{-6}$	$2,4356 \times 10^{-8}$	0,121781
	2	0,186	$3,2842 \times 10^{-6}$	$2,4418 \times 10^{-8}$	0,122090
	3	0,209	$3,8425 \times 10^{-6}$	$2,4631 \times 10^{-8}$	0,123157
NaOH 0,05 N	1	0,152	$2,4589 \times 10^{-6}$	$4,6220 \times 10^{-8}$	0,231101
	2	0,225	$4,2309 \times 10^{-6}$	$4,7010 \times 10^{-8}$	0,235049
	3	0,169	$2,8716 \times 10^{-6}$	$4,9003 \times 10^{-8}$	0,245014
NaOH 0,08 N	1	0,485	$1,0542 \times 10^{-5}$	$5,9425 \times 10^{-8}$	0,297126
	2	0,331	$6,8039 \times 10^{-6}$	$6,4248 \times 10^{-8}$	0,321241
	3	0,382	$8,0418 \times 10^{-6}$	$5,8232 \times 10^{-8}$	0,291160
NaOH 0,10 N	1	0,485	$1,0542 \times 10^{-5}$	$7,2955 \times 10^{-8}$	0,364776
	2	0,581	$1,2872 \times 10^{-5}$	$7,5365 \times 10^{-8}$	0,376824
	3	0,442	$9,4983 \times 10^{-6}$	$7,3687 \times 10^{-8}$	0,368435

En esta tabla se observa detalladamente los resultados obtenidos al analizar las cuatro concentraciones de hidróxido de sodio. Estos análisis se realizaron por triplicado y se determinó la concentración de azul de tripán absorbido en base a las formulas anteriormente mencionadas.

Anexo 2. Resultados de la Repetibilidad del método CAM-TBS

Tabla 17. Repetibilidad para el champú analizado

Muestra	Huevo N°	ABS	[] colorante (nmoles)	[] /mg	Cantidad de colorante absorbido (nmoles/mg)
Champú	1	0,188	$3,3328 \times 10^{-6}$	$4,1401 \times 10^{-8}$	0,207004
	2	0,269	$5,2989 \times 10^{-6}$	$4,3649 \times 10^{-8}$	0,218243
	3	0,257	$5,0077 \times 10^{-6}$	$4,0222 \times 10^{-8}$	0,201110
	4	0,307	$6,2213 \times 10^{-6}$	$4,2729 \times 10^{-8}$	0,213664
	5	0,305	$6,1728 \times 10^{-6}$	$4,1568 \times 10^{-8}$	0,207838
	6	0,319	$6,5126 \times 10^{-6}$	$4,2846 \times 10^{-8}$	0,214231
	7	0,316	$6,4398 \times 10^{-6}$	$4,2367 \times 10^{-8}$	0,211835
	8	0,309	$6,2699 \times 10^{-6}$	$4,0661 \times 10^{-8}$	0,203303
	9	0,330	$6,7796 \times 10^{-6}$	$4,0965 \times 10^{-8}$	0,204822
	10	0,336	$6,9253 \times 10^{-6}$	$3,9892 \times 10^{-8}$	0,199460
	11	0,352	$7,3136 \times 10^{-6}$	$3,9748 \times 10^{-8}$	0,198740
	12	0,370	$7,7506 \times 10^{-6}$	$4,1603 \times 10^{-8}$	0,208013
	13	0,543	$11,9499 \times 10^{-6}$	$4,1378 \times 10^{-8}$	0,206889
	14	0,248	$4,7892 \times 10^{-6}$	$4,0586 \times 10^{-8}$	0,202932
	15	0,307	$6,2213 \times 10^{-6}$	$4,1800 \times 10^{-8}$	0,208769
Promedio					0,207122 ± 0,005642
Desviación Estándar					0,005642
Coeficiente de variación (CV)					2,723755

En la tabla se observa los resultados de las 15 repeticiones de la muestra de champú, se analizaron los datos obtenidos con respecto a la fórmula para determinar la cantidad de colorante absorbido y se determinó que la técnica es repetible.

Anexo 3. Resultados de la Precisión intermedia del método CAM-TBS

Tabla 18. Precisión intermedia del champú analizado

Muestra	Analista / Día	Huevo N°	ABS	[] colorante (nmoles)	[] /mg	Cantidad de colorante absorbido (nmoles/mg)
Champú	A1/ Día 1	1	0,249	$4,8135 \times 10^{-6}$	$4,2149 \times 10^{-8}$	0,210747
		2	0,168	$2,8473 \times 10^{-6}$	$4,2560 \times 10^{-8}$	0,212802
		3	0,145	$2,2890 \times 10^{-6}$	$4,3683 \times 10^{-8}$	0,218416
	A2/ Día 1	4	0,448	$9,6439 \times 10^{-6}$	$4,2767 \times 10^{-8}$	0,213834
		5	0,328	$6,7311 \times 10^{-6}$	$4,2846 \times 10^{-8}$	0,214229
		6	0,258	$5,0319 \times 10^{-6}$	$4,2643 \times 10^{-8}$	0,213217
	Promedio					0,213874
	Desviación Estándar					0,002535
	Coeficiente de Variación (CV)					1,185045
	A1/Día 2	1	0,180	$3,1386 \times 10^{-6}$	$4,0655 \times 10^{-8}$	0,203276
		2	0,202	$3,6726 \times 10^{-6}$	$4,0626 \times 10^{-8}$	0,203130
		3	0,228	$4,3037 \times 10^{-6}$	$4,1865 \times 10^{-8}$	0,209324
	A2/Día 2	4	0,405	$8,6001 \times 10^{-6}$	$3,9669 \times 10^{-8}$	0,198343
		5	0,498	$1,0858 \times 10^{-6}$	$3,9918 \times 10^{-8}$	0,199588
		6	0,340	$7,0224 \times 10^{-6}$	$4,0498 \times 10^{-8}$	0,202490
	Promedio					0,202692
	Desviación Estándar					0,003824
	Coeficiente de Variación (CV)					1,886604

En la tabla se observa los resultados obtenidos al analizar el champú por triplicado con dos analistas y en días diferentes, cada resultado obtenido se procesó mediante las formulas anteriormente mencionadas y se determinó la concentración de colorante absorbido.

Anexo 4. Resultados de exactitud del método CAM-TBS

Tabla 19. Evaluación de la exactitud, mediante el porcentaje de recuperación

Muestra	Huevo N°	ABS	Concentración colorante (moles)	Conc/mg	Cantidad de colorante absorbido (nmoles/mg)
Champú	1	0,154	$2,5075 \times 10^{-6}$	$3,5516 \times 10^{-8}$	0,177582
	2	0,167	$2,8230 \times 10^{-6}$	$3,6806 \times 10^{-8}$	0,184030
	3	0,157	$2,5803 \times 10^{-6}$	$3,7779 \times 10^{-8}$	0,188893
Champú + NaOH 80%	1	0,213	$3,9396 \times 10^{-6}$	$6,2336 \times 10^{-8}$	0,311678
	2	0,243	$4,6678 \times 10^{-6}$	$6,3250 \times 10^{-8}$	0,316248
	3	0,221	$4,1338 \times 10^{-6}$	$6,2162 \times 10^{-8}$	0,310811
Champú + NaOH 100%	1	0,289	$5,7844 \times 10^{-6}$	$7,6615 \times 10^{-8}$	0,383073
	2	0,296	$5,9543 \times 10^{-6}$	$7,7429 \times 10^{-8}$	0,387147
	3	0,298	$6,0029 \times 10^{-6}$	$7,6178 \times 10^{-8}$	0,380892
Champu + NaOH 120%	1	0,345	$7,1437 \times 10^{-6}$	$9,4244 \times 10^{-8}$	0,471221
	2	0,361	$7,5321 \times 10^{-6}$	$9,4034 \times 10^{-8}$	0,470169
	3	0,345	$7,1680 \times 10^{-6}$	$9,5573 \times 10^{-8}$	0,477867

En la tabla anterior se observa los resultados obtenidos por triplicado de los análisis que se realizaron mediante la técnica de adición del patrón a tres concentraciones diferentes.

Tabla 20. Patrón de hidróxido de sodio (NaOH) para evaluar la exactitud mediante el método de patrón añadido.

Patrón	Huevo N°	ABS	Concentración colorante (moles)	Conc/mg	Cantidad de colorante absorbido (nmoles/mg)
NaOH 0,08 N	1	0,228	$4,3037 \times 10^{-6}$	$6,0530 \times 10^{-8}$	0,302652
	2	0,189	$3,3570 \times 10^{-6}$	$6,0596 \times 10^{-8}$	0,302982
	3	0,225	$4,2309 \times 10^{-6}$	$6,1946 \times 10^{-8}$	0,309728
NaOH 0,100 N	1	0,273	$5,3960 \times 10^{-6}$	$7,4634 \times 10^{-8}$	0,373169
	2	0,239	$4,5707 \times 10^{-6}$	$7,5300 \times 10^{-8}$	0,376501
	3	0,285	$5,6873 \times 10^{-6}$	$7,5329 \times 10^{-8}$	0,376643
NaOH 0,120 N	1	0,288	$5,7601 \times 10^{-6}$	$7,9341 \times 10^{-8}$	0,396703
	2	0,310	$6,2941 \times 10^{-6}$	$8,0591 \times 10^{-8}$	0,402954
	3	0,303	$6,1242 \times 10^{-6}$	$8,0688 \times 10^{-8}$	0,403441

Para obtener mejores resultados al realizar la prueba de adición del patrón, se realizó una curva de calibración del hidróxido de sodio a tres concentraciones, que posteriormente se utilizaron para la prueba. En la tabla anterior se observa las cantidades de colorante absorbido por triplicado.

Anexo 5. Resultados de la aplicación con el método CAM-TBS

Tabla 21. Resultados del método CAM-TBS de los champús analizados.

Muestra	Huevo N°	ABS	Concentración colorante (moles)	Conc/mg	Cantidad de colorante
Champú A	1	0,162	$2,7017 \times 10^{-6}$	$1,1081 \times 10^{-8}$	0,055407
	2	0,225	$4,2309 \times 10^{-6}$	$1,5009 \times 10^{-8}$	0,075042
	3	0,137	$2,0948 \times 10^{-6}$	$1,2359 \times 10^{-8}$	0,061794
Champú B	1	0,284	$5,6630 \times 10^{-6}$	$4,0566 \times 10^{-8}$	0,202831
	2	0,298	$6,0029 \times 10^{-6}$	$3,9571 \times 10^{-8}$	0,197853
	3	0,254	$4,9348 \times 10^{-6}$	$4,1400 \times 10^{-8}$	0,206998
Champú C	1	0,136	$2,0705 \times 10^{-6}$	$3,6135 \times 10^{-8}$	0,180675
	2	0,197	$3,5512 \times 10^{-6}$	$3,6573 \times 10^{-8}$	0,182865
	3	0,185	$3,2600 \times 10^{-6}$	$3,8173 \times 10^{-8}$	0,190863

En esta tabla se observa los resultados por triplicado que se realizó a las tres marcas de champú analizadas, obteniendo así las cantidades de colorante absorbido que determinaran el grado de irritabilidad de estos según la tabla 2.

ANEXO 6. Centro de crianza de gallinas ponedoras de la criandera Laura.



Figura 10. Granja de la criandera Laura: en esta figura se puede observar a las gallinas ponedoras de los huevos fertilizados en el distrito de Villa el Salvador, departamento de Lima

ANEXO 7. Aplicación del método HET-CAM.



Figura 11. Cámara de aire del huevo fertilizado: una vez observada la viabilidad del huevo, se procedió a romper la cascara del huevo con una pinza sin romper la capa superficial.



Figura 12. Capa superficial con suero fisiológico: se agregó suero fisiológico 0,9% durante 5 minutos para poder retirar la capa superficial.



Figura 13. Exposición de la CAM: se retira la capa superficial de la CAM para poder adicionar el champú analizado.

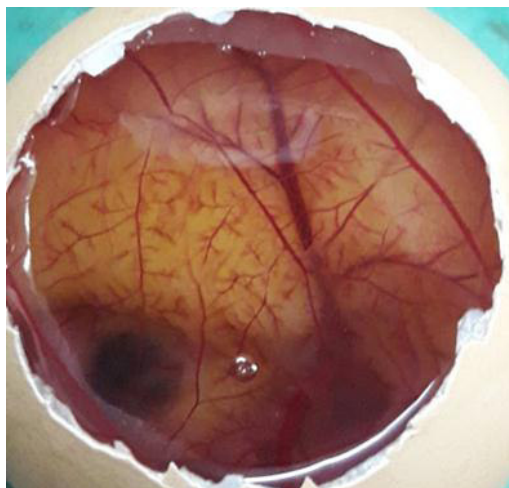


Figura 14. CAM con champú: se añadió el champú analizado y se evaluó el tiempo de aparición de lisis, coagulación hemorragia dentro de los 5 minutos.



Figura 15. Método cuantitativo (CAM-TBS): una vez enjuagado el champú de la CAM, se procedió a agregar azul de tripán 0,1% por 1 minuto y se retiró los restos de colorante con agua destilada.

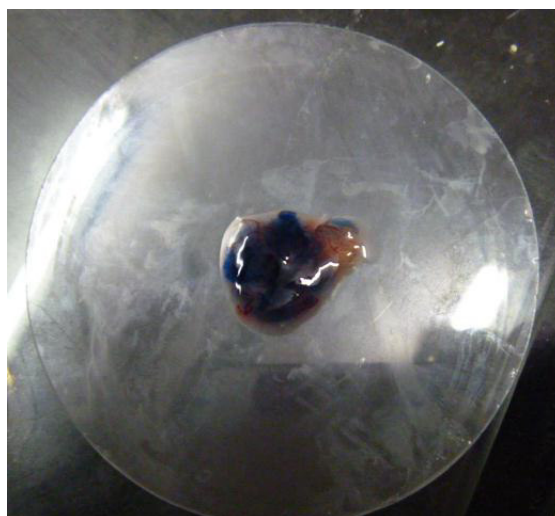


Figura 16. CAM teñida: se cortó la zona teñida de la CAM para posteriormente ser pasada y así poder determinar el índice de irritabilidad según la tabla 2.



Figura 17. CAM teñida en tubos con formamida: una vez pesada y cortada la membrana, se introdujo en un tubo que contenía Formamida para poder extraer todo el colorante absorbido por la CAM. La Formamida coloreada fue leída en el espectrofotómetro a 595 nm para determinar por formula el índice de irritabilidad.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AEFI: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria
- BGA: Agencia Federal de Salud Alemana
- BMFT: Ministerio Federal de Investigación y Tecnología Alemán.
- CAM: Membrana Corialantoidea
- CAM-TBS: Ensayo de la irritación de la membrana corialantoidea mediante tinción con azul de tripán
- CAMVA: Ensayo de irritabilidad en Membrana Corialantoidea Vascular
- COLIPA: Asociación Europea de Cosmética y Perfumería.
- CV: Coeficiente de variación
- ECVAM: Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos del Centro Común de Investigación.
- EEC: Comité de ética Europeo
- EPA: Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos.
- ESAC: Comité Científico Asesor del ECVAM.
- EU: Unión Europea
- FDA: Agencia de drogas y alimentos.
- GHS: Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de productos químicos
- HET-CAM: Ensayo de la membrana corialantoidea del huevo de gallina.
- ICCVAM: Comité Coordinador de Inter-agencias para la Validación de Métodos Alternativos (Centro Norteamericano)
- ICE: Ensayo en el ojo del pollo aislado.
- INVITTOX: *In vitro Toxicology*
- IRE: Ensayo en el ojo del conejo aislado.
- ISO: Organización Internacional de Normalización
- ISPCH: Instituto de Salud Pública de Chile
- MINAGRI: Ministerio de Agricultura y Riego
- NICEATM: Centro Interagencial para la Evaluación de Métodos Toxicológicos Alternativos.
- OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
- OPAL: Asociación Francesa para el bienestar de los animales de laboratorio

PEG: Polietilenglicol

pH: potencial de hidrogeniones.

RSD: Desviación Estándar Relativa

TER: Resistencia Eléctrica Transepitelial